



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

Tipagem molecular de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans*

Inês Filipa Horta Pancada Lopes da Silva

2010



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



Tipagem molecular de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans*

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas

Inês Filipa Horta Pancada Lopes da Silva

Tese apresentada para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular
em Medicina Tropical e Internacional

Orientadora: Investigadora Doutora Maria da Luz Martins

Co-Orientador: Doutor João Inácio

2010

Agradecimentos

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a execução do trabalho apresentado nesta dissertação.

Ao Doutor João Inácio pela ajuda na escolha do tema e pelo apoio e disponibilidade demonstrados durante este ano.

À minha orientadora de tese, Investigadora Doutora Maria da Luz Martins, por me ter aceite como sua orientanda, pelos seus sábios ensinamentos que muito contribuíram para a minha dedicação à Micologia Médica, pelos preciosos e experientes conselhos em horas mais difíceis da minha vida, pelo constante apoio, incentivo e enorme amizade demonstrada. Aqui dedico o meu agradecimento e reconhecimento à sua disponibilidade, generosidade, simpatia, dedicação profissional à sua postura como docente e, principalmente à fantástica pessoa que é! Obrigada por tudo!

Obrigada por não terem desistido de mim, quando eu própria já não acreditava que fosse possível terminar esta tese devido aos obstáculos e exigências impostas durante este tempo.

Aos meus colegas e professores de Mestrado.

Ao Eduardo e à Ana Sofia pelo companheirismo e amizade durante estes anos.

À Marisa pelos bons momentos partilhados, amizade... por tudo!

À Paula um agradecimento especial pela disponibilidade e ajuda para que tudo fosse possível de se realizar, pela amizade e pelos belos momentos de descontração partilhados.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre me apoiaram e acompanharam, mesmo nas horas mais difíceis.

Agradeço ao Carlos pelo apoio incondicional, amor, carinho, compreensão, e por tudo, pois sem ele tornar-se-ia tudo ainda mais difícil.

À minha filha, Margarida, que resolveu "aparecer", no ano curricular deste mestrado, por todas as minhas horas de ausência "forçadas", pela falta de tempo, cansaço, por tudo... Foste a melhor coisa que me aconteceu na vida!

À minha família, sem excepção, principalmente ao meu Pai, ao meu Tio Tó-Zé, à minha Tia Lena, às minhas primas por sempre acreditarem em mim. Às minhas avós por tudo e por lhes poder dar o prazer de me verem a terminar este tão desejado mestrado.

E por último, um agradecimento muito especial à minha Mãe por todo o apoio, ajuda, encorajamento constante, amizade e compreensão nas horas mais difíceis da minha vida! Por tudo, sem excepção. A ela dedico todo este trabalho pois, mais uma vez, sem a sua ajuda, todo este trabalho não seria possível!

Resumo

As micoses estão incluídas entre as doenças infecciosas mais ubíquas em todo o mundo, afectando todos os estratos sociais e todos os grupos etários numa variedade de manifestações superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistémicas. Um diagnóstico rápido e eficaz destas doenças, com uma correcta identificação da espécie fúngica responsável pela infecção, é essencial para um planeamento do tratamento mais eficaz para o doente infectado. Tem-se registado um aumento da incidência das infecções fúngicas também em consequência do aumento do número de casos de doentes imunodeprimidos, devido particularmente à crescente utilização de terapêuticas imunossupressivas, procedimentos médicos invasivos, prescrição de tratamentos prolongados, entre outros aspectos. O aparecimento da epidemia da Imunodeficiência Humana no início da década de 80, causada pelo vírus VIH, contribuiu também decisivamente para o aumento das infecções fúngicas oportunistas.

A Criptococose é uma infecção fúngica, predominantemente oportunista e com uma distribuição epidemiológica mundial, causada por leveduras encapsuladas do género *Cryptococcus*. A espécie clinicamente mais relevante é *Cryptococcus neoformans*, cujas estirpes têm sido tradicionalmente classificadas em cinco serotipos relacionados com os antígenos da respectiva cápsula polissacárida: A (*C. neoformans* var. *grubii*); D (*C. neoformans* var. *neoformans*); B e C (actualmente reconhecidos como uma espécie distinta mas filogeneticamente próxima, *C. gattii*); e AD (estirpes híbridas).

O presente trabalho teve como principal objectivo determinar retrospectivamente os tipos moleculares de uma colecção alargada de estirpes de *C. neoformans*, isoladas e mantidas durante os últimos 18 anos no Laboratório de Micologia do IHMT/UNL. A maioria das estirpes foi isolada de doentes imunodeprimidos com criptococose, existindo também algumas estirpes de origem ambiental. Foi utilizada a técnica de PCR-RFLP do gene *URA5* para diferenciar as estirpes de *Cryptococcus neoformans*, tendo sido detectados quatro tipos moleculares: VN1 e VN2 (relacionados com *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A); VN3 (relacionado com as estirpes híbridas de serotipo AD); e VN4 (relacionado com *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D). Não foram encontrados entre os isolados de origem clínica perfis de restrição correspondentes aos tipos moleculares VG1, VG2, VG3 e VG4 (relacionados com *C. gattii*, serotipos B e C). O tipo molecular VN1 foi o mais abundante entre os isolados de origem clínica (45% dos isolados), seguindo-se o grupo de

estirpes híbridas do tipo molecular VN3 (31%). Os tipos moleculares menos abundantes entre os isolados foram o VN2 (12%) e VN4 (12%). A standardização do método de tipagem molecular utilizado neste trabalho permite comparar os resultados obtidos com os de outros estudos epidemiológicos semelhantes, realizados noutras regiões do globo e publicados em anos recentes, contribuindo para um conhecimento melhorado da epidemiologia global deste importante fungo patogénico. Em Portugal obteve-se uma percentagem mais elevada de isolados dos grupos moleculares VN1 e VN3 em relação a outros países da Europa e América Latina, em que os tipos mais abundantes são VN1 e VN2. Nestas mesmas regiões, o tipo molecular VN4, relacionado com as estirpes de *C. neoformans* var. *neoformans* do serotipo D, é muito raro. Esta variedade é mais comum em zonas mediterrâneas e está muito associada a casos clínicos de infecções cutâneas associadas a infecções do Sistema Nervoso Central. Este tipo molecular parece ser também significativamente mais abundante no nosso país.

Abstract

Mycoses are amongst the infectious diseases that are very dangerous affecting all social status in several ways all over the world. These infectious diseases can be superficial, cutaneous, subcutaneous and invasive or systemic, spreading all over the body. A fast and efficient diagnosis of these diseases, including a correct identification of the respective etiological agents, is essential to plan the best treatment to be applied to the patients. An increase in the number of people infected by fungal infections is registered worldwide, as a consequence of an increase in the number of cases of immunocompromised patients and of immunosuppressive therapies, invasive medical procedures and prolonged prescribed treatments, among other aspects. The outcome of the human immunodeficiency epidemics at the beginning of the 80's, caused by HIV, has also contributed to the increase of the occurrence of opportunistic mycoses.

Cryptococcosis is a fungal infection caused by several species of *Cryptococcus* and presents a worldwide epidemiologic distribution. The most clinically relevant species is *Cryptococcus neoformans*, whose strains have been traditionally classified into five serotypes related with the antigens of the respective polysaccharide capsules: serotype A (*C. neoformans* var. *grubii*), D (*C. neoformans* var. *neoformans*); B and C (presently recognised as a distinct but closely related species, *C. gattii*); and AD (hybrid strains).

The main objective of this work was to retrospectively determine the molecular types of a large group of *C. neoformans* strains that were isolated and maintained for the last 18 years in the Mycology lab of IHMT/UNL. Most of these strains were isolated from immunocompromised patients with Cryptococcosis. The PCR-RFLP of the *URA5* gene was used to differentiate the strains. Four molecular types were detected among the isolates: VN1 and VN2 (related to *C. neoformans* var. *grubii*, serotype A); VN3 (related with hybrid strains of the serotype AD); and VN4 (related with *C. neoformans* var. *neoformans*, serotype D). Molecular types VG1, VG2, VG3 and VG4, related with *C. gattii*, were not found. VN1 was the most abundant molecular type among clinical isolates (45% of the isolates), followed by VN3 (31%) and VN2 and VN4, both corresponding to 12% of the clinical isolates. The standardized typing method used in this work allowed comparing our results with other recent epidemiological studies on the same subject. In Portugal we have found a greater percentage of *C. neoformans* molecular types VN1 and VN3 whilst in other European and Latin American countries the most abundant types were

VN1 and VN2. Type VN4 was also found to be more abundant in our country. This type seems to be common in Mediterranean areas and is associated to cutaneous manifestations of infections of the central nervous system.

Lista de abreviaturas

A	Adenina
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>
C	Citosina
C.	<i>Cryptococcus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAses	Desoxirribonucleases
dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
EDTA	Acido etilenoaminotetraacético
EtBr	Brometo de etídio
G	Guanina
GXM	Glucuronoxilomanano
IGS	<i>Inter-Genic Spacer</i>
ITS	Internal Transcribed Spacer Regions
LBA	Lavado bronco-alveolar
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MS-PCR	<i>Micro-satellite primed PCR</i>
NASBA	<i>Nucleic acid sequence-based amplification</i>
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salino de fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema nervoso central
sp.	Espécie
spp.	Espécies
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris, ácido bórico e EDTA
var.	Variedade
VIH	Vírus da imunodeficiência adquirida

Índice de matérias

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Lista de abreviaturas	vi
Índice de matérias	vii
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	ix
1. Introdução geral	1
1.1. Características gerais dos fungos	2
1.2. Taxonomia	4
1.3. Importância clínica das micoses humanas	5
1.4. Diagnóstico laboratorial das micoses	6
1.4.1. Diagnóstico convencional	6
1.4.2. Diagnóstico molecular	8
1.5. Objectivos do trabalho e plano da dissertação	9
2. <i>Cryptococcus neoformans</i> e a criptococose	10
2.1. Taxonomia de <i>Cryptococcus neoformans</i>	10
2.2. Ecologia e epidemiologia de <i>Cryptococcus neoformans</i>	12
2.3. Factores de virulência de <i>Cryptococcus neoformans</i>	13
2.4. Importância clínica e manifestações da criptococose	16
3. Métodos de diagnóstico laboratorial e identificação de <i>Cryptococcus neoformans</i>	19
3.1. Diagnóstico convencional	19
3.1.1. Exame directo das amostras	19
3.1.2. Detecção do antígeno criptocócico	21
3.1.3. Isolamento em cultura e identificação	22
3.1.4. Outros métodos de diagnóstico	24
3.1.5. Serotipagem	25
3.2. Diagnóstico molecular de <i>Cryptococcus neoformans</i>	25
3.3. Epidemiologia molecular de <i>Cryptococcus neoformans</i>	27
4. Materiais e métodos	29
4.1. Estirpes estudadas	29
4.2. Extracção de DNA genómico	29
4.3. RFLP do gene <i>URA5</i>	30
4.4. Análise dos perfis electroforéticos e dendrogramas	31
5. Resultados	32
5.1. Estirpes estudadas	32
5.2. RFLP do gene <i>URA5</i>	40
6. Discussão de resultados e considerações finais	46
7. Referências bibliográficas	50

Índice de figuras

Figura 1.1. Aspecto morfológico macroscópico dos fungos: colónias de fungo leveduriforme e colónias de fungos filamentosos	3
Figura 1.2. Classificação clínica das principais infecções fúngicas	6
Figura 2.1. Células de <i>Cryptococcus neoformans</i> em exame a fresco de LCR de um doente com criptococose, corado com Tinta-da-China (a qual põe em evidência a cápsula)	10
Figura 2.2. Percurso provável da disseminação de <i>Cryptococcus neoformans</i> como agente etiológico da criptococose	17
Figura 3.1. Exame directo <i>in vivo</i> , de células encapsuladas de <i>C. neoformans</i>	19
Figura 3.2. Teste de aglutinação para detecção de antígeno circulante de <i>C. neoformans</i>	21
Figura 3.3. Colónias cremosas e mucóides de <i>C. neoformans</i> em cultura após 5 dias de incubação e cultura mista de <i>Candida</i> sp. e <i>C. neoformans</i> em meio de Staib. As colónias acastanhadas são de <i>C. neoformans</i> pois somente esta espécie produz melanina	23
Figura 5.1. Distribuição dos isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> estudados por amostra de origem, sexo, idade dos doentes infectados e ano de entrada da estirpe na colecção de culturas do IHMT.	39
Figura 5.2. Perfis de restrição do gene <i>URA5</i> com as enzimas <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> das estirpes de referência representantes dos vários tipos moleculares descritos de <i>C. neoformans</i>	40
Figura 5.3. Ilustração dos perfis de restrição do gene <i>URA5</i> com as enzimas <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> para alguns dos isolados clínicos, ambientais e de referência de <i>C. neoformans</i> testados	41
Figura 5.4. Dendrograma baseado no agrupamento dos perfis de restrição do gene <i>URA5</i> com as enzimas <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> dos isolados clínicos, ambientais e de referência de <i>C. neoformans</i> testados	42
Figura 5.5. Distribuição dos tipos moleculares de <i>Cryptococcus neoformans</i> encontrados entre os isolados de origem clínica em função de número total dos isolados, dos isolados a partir de LCR e de sangue, dos isolados em função da data de entrada na colecção do IHMT, correspondentes também à sua data de isolamento, e em função da gama de idades dos doentes infectados	44
Figura 5.6. Distribuição dos tipos moleculares encontrados entre os isolados ambientais de <i>Cryptococcus neoformans</i>	45

Índice de tabelas

Tabela 2.1. Espécies e variedades do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i>	11
Tabela 5.1. Estirpes de referência utilizadas, respectiva origem, serótipo e tipo molecular	32
Tabela 5.2. Estirpes de origem clínica utilizadas e respectivas amostras biológicas, sexo e idade dos doentes e hospitais de origem, data de isolamento, serótipo e tipo molecular	33
Tabela 5.3. Estirpes de origem ambiental utilizadas e respectivas amostras e locais de origem, data de isolamento e tipo molecular	38

1. Introdução geral

A Micologia é a ciência que se dedica ao estudo dos fungos. Embora actualmente pertençam a um reino próprio, o Reino *Fungi*, estes organismos foram durante muito tempo considerados membros primitivos do Reino *Plantae*. No entanto, o conhecimento dos fungos tem evoluído profundamente, em grande parte devido aos desenvolvimentos verificados ao nível da compreensão das suas características fisiológicas, ciclos de vida, microscopia, bioquímica e genética, o que tem permitido uma mais ampla caracterização estrutural e funcional dos elementos deste reino, definindo de forma incontestável um reino à parte. A Micologia diversifica os seus estudos por diversas áreas comuns à botânica clássica, como a taxonomia, anatomia, fisiologia, filogenia e a ecologia. Os estudos da distribuição e ocorrência dos fungos estão directamente relacionados com áreas de investigação da zoologia e da botânica, já que a distribuição destes organismos está frequentemente ligada não apenas às condições físico-químicas e ambientais do meio, mas também à distribuição de determinados animais e plantas, os quais funcionam como hospedeiros específicos para uma determinada espécie, ou conjunto de espécies, de fungos. A Micologia aplicada é uma área de investigação com profundo interesse antropológico, dada a diversidade de características que os elementos do reino *Fungi* apresentam, desde patogénicos (podendo ser mortais), até indispensáveis ao combate de infecções bacterianas, eles são uma presença omnipresente no dia-a-dia. As áreas de intervenção da Micologia aplicada são múltiplas e muito diversificadas, passando pela alimentação (produção de queijos, pão, bebidas alcoólicas) até à indústria do fabrico de fármacos. Desde longa data que os fungos, sobretudo as leveduras, são utilizados na indústria como agentes fermentativos na indústria panificadora, láctea e de produção de vinho, cerveja, etc. Na medicina, desde a descoberta da penicilina (primeiro antibiótico, obtido a partir do fungo *Penicillium notatum*) em 1928 por Alexander Fleming, a esperança média de vida não parou de aumentar, em grande parte devido a ser possível combater as infecções bacterianas com êxito. Mais recentemente, por meio de engenharia genética, tem sido possível utilizar algumas espécies fúngicas na produção industrial de numerosos fármacos, antibióticos, proteínas recombinantes, enzimas, vitaminas, pigmentos e biopolímeros, entre outros compostos. A micologia é ainda uma ciência em pleno desenvolvimento, não apenas do ponto de vista descritivo mas, sobretudo, do ponto de vista de aplicação dos conhecimentos relativos aos fungos no dia-a-dia do homem (micologia aplicada).

Os fungos podem ser também causadores de infecções no homem muitas vezes mortais. A Micologia Médica é assim uma sub-disciplina da microbiologia que estuda os fungos patogénicos para o Homem. Apesar do aumento evidente da morbilidade e mortalidade devido a micoses, isto é, infecções provocadas por fungos, existe também a percepção de que os programas para a investigação e educação em micologia clínica não têm aumentado nessa proporção, tanto em estrutura como em alcance, originando uma lacuna imensa na formação adequada de pessoas especializadas nesta área, principalmente na área da clínica médica (Steinbach *et al.* 2003). Os avanços da medicina no tratamento de doenças crónicas (quimioterapia), a frequência de transplantes de órgãos, nomeadamente de medula óssea, o uso de técnicas invasivas nos doentes, a prescrição de tratamentos prolongados e a imunodeficiência humana causada pelo vírus VIH no início da década de 80, foram os factores mais importantes que contribuíram para um aumento da incidência das infecções fúngicas, principalmente por fungos oportunistas (Steinbach *et al.* 2003). Como consequência desta situação, o número e os tipos de tratamento destas infecções tem igualmente sofrido uma evolução marcada nestes últimos anos. Deste modo, os profissionais ligados à saúde deveriam tomar consciência da necessidade de adquirir um conhecimento mais amplo acerca da Micologia Médica e, acima de tudo, do desenvolvimento de novos métodos mais sensíveis, rápidos e eficazes de diagnóstico das infecções fúngicas. Para Steinbach e colaboradores (2003), a Micologia Médica deste novo milénio, como consequência da emergência de novos agentes etiológicos, deveria contemplar um melhor controlo da ocorrência das infecções fúngicas, a formação de mais micologistas e a promoção de um ensino médico especializado e de qualidade.

1.1. Características gerais dos fungos

Os fungos são organismos eucariotas, unicelulares ou pluricelulares, sendo delimitados exteriormente por uma parede celular rígida, essencialmente quitinosa (polímero de N-acetilglucosamida). Têm capacidade de se reproduzir por diferentes processos, sexuais e assexuais, e são considerados um dos principais decompositores da matéria orgânica do nosso planeta. De um modo geral, os fungos apresentam vida livre na natureza. Actualmente, considera-se que existem cerca de 100 mil espécies de fungos descritas e, tanto quanto se sabe, destas, aproximadamente 100 são reconhecidas como espécies patogénicas para o Homem e animais (De Hoog *et al.* 2000; Richardson & Warnock, 2003).

Os fungos são seres heterotróficos, isto é, realizam decomposição oxidativa de substâncias orgânicas devido à libertação de enzimas hidrolíticas extracelulares para posteriormente absorverem os compostos através da parede celular. Como não possuem clorofila nem outro processo de autotrofismo, podem ser parasitas, saprófitas ou simbiontes. Para o seu desenvolvimento e manutenção, estes microrganismos exigem que haja, no meio onde vivem, fontes de carbono e de azoto. A humidade do meio é outro factor fundamental para o seu crescimento. Quando se desenvolvem como saprófitas, que inclui o crescimento nos meios de cultura laboratorial, os fungos formam diferentes tipos de colónias e podem desenvolver estruturas de frutificação complexas e/ou mecanismos elaborados de propagação e dispersão. De um modo geral, os fungos apresentam duas morfologias muito distintas capazes de ser diferenciadas tanto macroscópica como microscopicamente: as leveduras (fungos unicelulares) e os fungos filamentosos (fungos pluricelulares) (Figura 1).

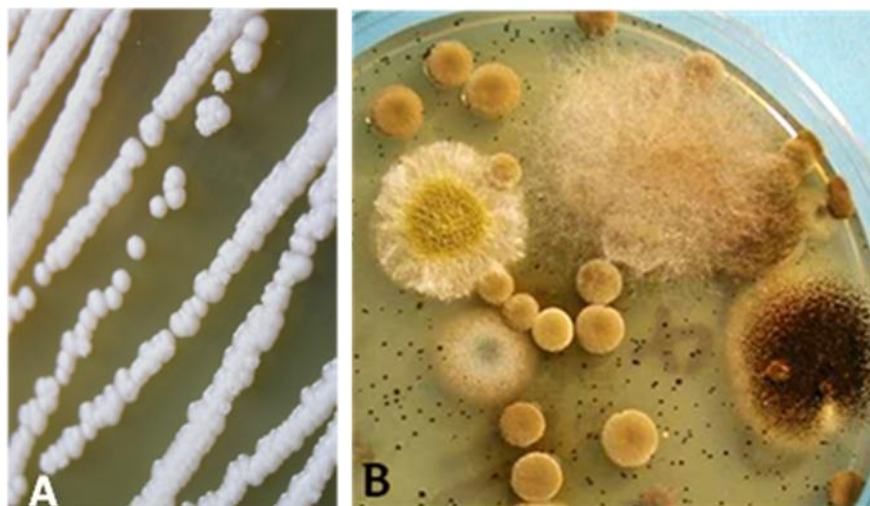


Figura 1. Aspecto morfológico macroscópico dos fungos: (A) Colónias de fungo leveduriforme; e (B) Colónias de fungos filamentosos (Fotografia do Laboratório de Micologia do IHMT).

As colónias das leveduras são, em geral, de consistência cremosa, brilhantes ou opacas, de superfície húmida ou mucosa e de coloração que pode variar de branca ou creme a alaranjada ou negra, dependendo da espécie. Reproduzem-se, na sua maioria, por gemulação, embora algumas espécies raras o façam por fissão binária (De Hoog *et al.* 2000). As colónias dos fungos filamentosos podem ter textura aveludada, algodoadada, granulosa ou pulverulenta. Nestes, quando os esporos (assexuados ou sexuados) germinam, dão origem a filamentos que são denominados por hifas. Estas podem estar divididas em

células separadas por septos - hifas septadas - ou não possuem septos que se designam por hifas cenocíticas (Richardson & Warnock, 2003). Um conjunto de hifas forma o chamado micélio, que pode ser aéreo quando se projecta acima da superfície do substrato, ou submerso, responsável pela absorção dos nutrientes. Quando o micélio aéreo se diferencia e passa a sustentar as estruturas de frutificação (assexuadas ou sexuadas), designa-se por micélio reprodutor.

Nas estruturas de reprodução sexuada formam-se esporos sexuais que são designados de acordo com o grupo a que o fungo pertence: zigósporos no caso dos fungos zigomicetas, ascósporos nos ascomicetas e basidiósporos nos basidiomicetas (estados teleomórficos resultantes de reprodução sexuada). Os conídios são os esporos resultantes da reprodução assexuada e podem apresentar dimensões, formas, cores e septação muito variáveis conforme os géneros ou as espécies dos fungos (estado anamórfico resultante de reprodução assexuada). Nos fungos patogénicos para o homem, a reprodução dos fungos no estado parasitário é sempre assexuada (Guarro *et al.* 1999). Muitos fungos, incluindo alguns clinicamente importantes, são capazes de desenvolver duas formas morfológicas diferentes *in vivo* e *in vitro*, em geral filamentosa ou leveduriforme, dependendo das condições do meio, designando-se por fungos dimórficos.

1.2. Taxonomia

Os Fungos são um vasto grupo de organismos classificados no Reino *Fungi*, pertencente ao Domínio Eukarya. Estão incluídos neste grupo organismos de dimensões consideráveis, mas também muitas formas microscópicas, como bolores e leveduras. Apesar de, como já atrás foi referido, estarem descritas cerca de 100.000 espécies de fungos, talvez existam até 1,5 milhões de espécies, sendo que a maioria ainda está por ser identificada e descrita pelos micologistas. Nos anos mais recentes, a introdução de novas abordagens filogenéticas e de novas técnicas moleculares, particularmente a análise de sequências nucleotídicas do DNA (tais como DNA ribossómico), tem contribuído significativamente para a alteração dos conceitos tradicionais sobre a classificação e a sistemática dos fungos.

Os fungos patogénicos podem ser classificados em três divisões, ou filos, do Reino *Fungi*. Os Zigomicetas são os fungos mais simples, contêm hifas cenocíticas com numerosos núcleos haplóides. Estes fungos reproduzem-se assexuadamente pela formação de esporangiósporos produzidos em esporângios, estruturas que estão presentes na extremidade de hifas aéreas. Cada esporo libertado pode dar origem a um novo micélio. Os

Ascomicetas são fungos que apresentam um micélio constituído por hifas septadas. Estes fungos reproduzem-se assexuadamente por intermédio de conidiósporos e sexuadamente por intermédio da formação de ascósporos, que são esporos haplóides existentes em estruturas designadas de ascos. Milhares de ascos podem formar um ascocarpo. Cerca de 90% dos fungos outrora classificados como Deuteromicetas, ou fungos imperfeitos, assim designados por não terem, ou não ter sido ainda observada, uma fase sexuada de reprodução, foram reclassificados como Ascomicetas após o seu estudo com recurso a técnicas de biologia molecular. É disto um bom exemplo a levedura patogénica oportunista *Candida albicans*. Por último, os **Basidiomicetas** apresentam também hifas septadas. Estes fungos produzem um tipo de esporos sexuais, os basidiósporos, suportados por uma estrutura característica, com forma de dedos, o basídio, produzido na extremidade distal de uma hifa binucleada. A maior parte dos fungos basidiomicetas são saprófitas e decompõem matéria orgânica. Neste grupo inclui-se a levedura *Cryptococcus neoformans*, um importante agente patogénico em humanos responsável pela criptococose, objecto de estudo nesta dissertação, e que corresponde ao estado anamórfico de *Filobasidiella neoformans*.

1.3. Importância clínica das micoses humanas

Denominam-se micoses às infecções humanas ou animais originadas por fungos. Em Micologia Médica a classificação das micoses relaciona-se com a sua localização no organismo humano. As micoses dividem-se em superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistémicas e, dentro destas, as micoses oportunistas. Na Figura 1.2. estão agrupadas as micoses mais relevantes de acordo com a sua classificação clínica. As micoses estão a surgir, de uma forma geral, com cada vez com maior frequência e gravidade. Este facto tem origem, como já atrás foi realçado, não só no aumento do número e frequência das doenças crónicas nos últimos anos, mas também na crescente utilização de práticas médicas e terapêuticas mais agressivas e invasivas e na manutenção de doentes em estados cada vez mais debilitados. Estas infecções constituem cada vez mais um grave problema de saúde pública, principalmente em relação às micoses oportunistas. Nestas incluem-se igualmente as que são adquiridas no próprio ambiente hospitalar (infecções nosocomiais), sobre as quais existe actualmente uma crescente consciência e preocupação visto induzirem morbilidade e mortalidade elevadas.

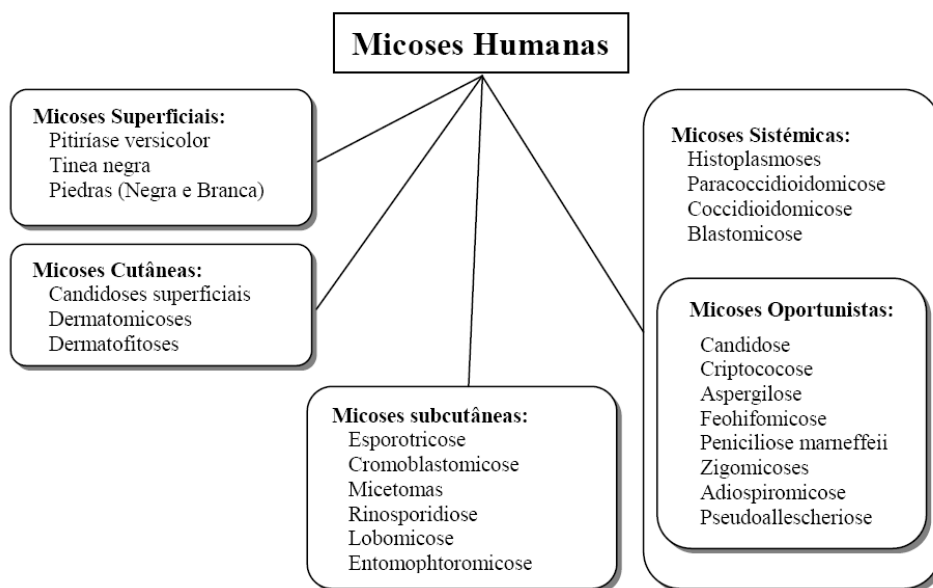


Figura 1.2. Classificação clínica das principais infecções fúngicas

Actualmente, o maior desafio para os clínicos consiste, não só na avaliação do número e gravidade dos casos de infecção, como também no acesso a um diagnóstico rápido e específico para o maior número possível de micoses.

1.4. Diagnóstico laboratorial das micoses

1.4.1. Diagnóstico convencional

O diagnóstico laboratorial é essencial para o conhecimento da etiologia das doenças infecciosas, através da identificação do agente etiológico em causa. Actualmente, o diagnóstico laboratorial pode também incluir a avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos e a utilização de técnicas moleculares de tipagem de microrganismos, pois estas são técnicas muito mais sensíveis para a sua diferenciação intraspecífica. Um diagnóstico micológico rápido possibilita a prescrição atempada do tratamento antifúngico específico mais adequado, permitindo igualmente o uso racional da terapêutica e, deste modo, entre outros factores, a prevenção do desenvolvimento de resistências por parte dos agentes etiológicos.

Não obstante a experiência do micologista, é preciso ter em conta que o isolamento e identificação correcta do fungo patogénico a partir de material biológico só serão possíveis se a colheita e o transporte das amostras biológicas forem adequadamente realizados. Tendo em conta que as micoses podem ocorrer em qualquer localização do organismo

humano, é necessário estabelecer a metodologia de colheita mais apropriada para cada tipo de produto biológico. O material deverá ser colhido, de preferência, no laboratório. No entanto, caso não seja possível, este deverá ser rapidamente enviado para o mesmo, de modo a evitar possíveis contaminações ou perda de viabilidade celular. Todas as amostras devem ser transportadas em recipientes esterilizados e processadas o mais rapidamente possível. Se o seu processamento não se realizar até no máximo três horas, as amostras devem ser mantidas a 4 °C e nunca devem ser congeladas. A amostra deverá ser colhida antes do início de qualquer terapêutica, principalmente de terapêutica antifúngica, para não alterar a sintomatologia e o aspecto das lesões e se obter falsos resultados laboratoriais. Caso o doente já tenha iniciado a aplicação de medicação tópica, quer esta tenha acção antifúngica ou não, deverá suspendê-la pelo menos uma semana antes da realização da colheita, uma vez que aquela pode dificultar a observação microscópica (exame directo) ou mesmo impedir o desenvolvimento do fungo em cultura. Por último, a colheita deve contemplar uma quantidade de material suficiente para a realização de vários exames, como sejam um ou mais exames directos, a realização de mais do que um inóculo em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação e, eventualmente e cada vez mais frequente, para a realização de testes moleculares.

O resultado do exame directo é muito rápido, dado normalmente no próprio dia e, se for positivo, pode fornecer resultados muito antes das culturas que levam dias ou semanas (Brasil *et al.* 2003). No caso da levedura *Cryptococcus neoformans*, a realização do exame directo com Tinta-da-China permite a observação da presença de cápsula extracelular polissacarídea produzida por este microrganismo e, em poucos minutos, pode-se informar os clínicos da existência de infecção (Martins, 2001). A principal limitação do exame directo é o de ser pouco sensível ou incapaz, na maioria dos casos, de possibilitar a identificação do fungo ao nível da espécie. Para esse efeito é imprescindível a realização do exame cultural, sendo essencial a escolha do meio de cultura mais apropriado que permita o desenvolvimento de todo e qualquer fungo que exista nela. Este deve ser adicionado de certos compostos que melhorem o isolamento dos fungos patogénicos, como por exemplo, o cloranfenicol e a cicloheximida que inibem o crescimento de outros microrganismos, como as bactérias e outros fungos saprófitas filamentosos, respectivamente.

A temperatura óptima para o crescimento da maioria dos fungos patogénicos é de 30 °C, apesar dos fungos também crescerem bem à temperatura ambiente. A duração da

incubação varia muito consoante a espécie em causa. As leveduras necessitam entre 2 a 5 dias de incubação enquanto os fungos filamentosos patogénicos podem exigir incubações de, pelo menos, 4 semanas para que se observe desenvolvimento de colónias (De Hoog *et al.* 2000). A identificação das culturas varia também consoante o tipo de fungo. As leveduras são identificadas, geralmente, por métodos bioquímicos enquanto os fungos filamentosos são identificados por observação das suas características macroscópicas e microscópicas. Embora os métodos convencionais de identificação sejam imprescindíveis para a identificação dos fungos causadores de uma infecção, estes métodos são normalmente morosos, principalmente quando se trata de fungos filamentosos. Se for também contemplado o tempo necessário para a realização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos, fica seriamente comprometida uma resposta em tempo útil, tão necessária para a prescrição do tratamento mais adequado aos doentes.

1.4.2. Diagnóstico molecular

O diagnóstico de leveduras patogénicas tem-se baseado essencialmente em caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, mas não é raro surgirem dificuldades na identificação de alguns isolados devido à variabilidade natural das espécies. Os métodos fenotípicos não são, muitas vezes, suficientemente fiáveis e são, por outro lado, trabalhosos e morosos. Embora a introdução de metodologias enzimáticas e serológicas tenha contribuído, nos últimos anos, para abreviar e, de certa forma, melhorar a sensibilidade do diagnóstico laboratorial, continua a ser essencial um método de identificação ainda mais específico e sensível que satisfaça de forma eficaz as solicitações da clínica médica. O impacto crescente da aplicação de técnicas moleculares, quer na elucidação das relações filogenéticas entre diferentes grupos de organismos, quer no desenvolvimento de novos métodos de identificação e detecção dos mesmos, tem resultado numa explosão de trabalhos científicos e de aplicações comerciais que têm procurado no diagnóstico molecular alternativas à identificação e detecção fenotípica tradicional dos agentes causadores de doenças infecciosas. O diagnóstico molecular é considerado mais rápido, sensível, específico e de fácil execução do que os métodos convencionais, o que o torna fundamental quando há urgência no diagnóstico. No entanto, estes métodos requerem normalmente tecnologias mais sofisticadas, sendo também por este motivo mais dispendiosos, pelo que a sua utilização na rotina laboratorial está limitada a apenas alguns laboratórios de diagnóstico (Carvalho *et al.* 2007; Lucas *et al.* 2010).

Têm sido descritas várias aplicações moleculares para o diagnóstico e monitorização de infecções fúngicas, bem como para a tipagem dos isolados em estudos epidemiológicos. Estas aplicações utilizadas na detecção, identificação e tipagem de fungos patogénicos são, na sua maior parte, baseadas na amplificação de fragmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Entre as metodologias mais utilizadas para a identificação e tipagem de fungos contam-se a cariotipagem electroforética em campo pulsado (PFGE - *Pulse Field Gel Electrophoresis*) (Perfect *et al.* 1989) e o estudo de polimorfismos de regiões microsatélites do DNA por amplificação das mesmas com primers únicos (MS-PCR, do Inglês *Micro Satellite primed-PCR*), entre outras (Martins, 2001).

1.5. Objectivos do trabalho e plano da dissertação

O presente trabalho teve como principal objectivo realizar um estudo retrospectivo de uma colecção alargada de estirpes de *Cryptococcus neoformans*, mantidas no IHMT/UNL e na sua maioria isoladas nos últimos 18 anos a partir de doentes imunocomprometidos com criptococose, recorrendo à sua caracterização através da técnica de RFLP do gene *URA5*.

Esta dissertação está dividida em seis secções. Na primeira secção é feita uma introdução geral à Micologia Médica, onde se destacam as características gerais dos fungos e a sua taxonomia, a importância clínica das micoses humanas e os métodos gerais utilizados no diagnóstico laboratorial das micoses. Na segunda secção é feita uma análise alargada sobre a criptococose e o seu principal agente, a espécie *Cryptococcus neoformans*. Os métodos utilizados normalmente no diagnóstico laboratorial e identificação deste agente são descritos na terceira secção desta dissertação. Na quarta secção descrevem-se os materiais e métodos utilizados neste trabalho. A quinta secção corresponde aos resultados obtidos e, finalmente, na sexta e última secção, é feita uma análise crítica e discussão dos resultados e considerações finais sobre o trabalho.

2. *Cryptococcus neoformans* e a criptococose

As leveduras de interesse clínico que causam infecção no homem pertencem principalmente a dois géneros, *Candida* e *Cryptococcus*. Neste trabalho consideramos a espécie *Cryptococcus neoformans* no seu sentido lato, que inclui as espécies filogeneticamente muito próximas *C. neoformans* e *C. gattii*. *Cryptococcus neoformans* é uma levedura clinicamente importante, causando meningoencefalite potencialmente fatal, podendo disseminar-se a outros órgãos ou sistemas. É considerada uma levedura patogénica oportunista, sendo uma causa de infecção mais frequentemente em doentes com deficiência imunitária celular (Hull & Heitman, 2002). *C. neoformans* foi pela primeira vez considerado fungo patogénico para humanos em 1894. Porém, só durante a primeira metade do século XX é que foi consolidado o estatuto de *C. neoformans* como organismo patogénico (Casadevall & Perfect, 1998).

2.1. Taxonomia de *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans pertence ao Filo Basidiomycota. Possui uma forma esférica ou globular característica, com diâmetro aproximado de dois a oito micrometros e com uma cápsula constituída por mucopolissacáridos (Figura 2.1), a qual cerca de 90% é constituída por glucoronoxilomananos (GXM; compostos por ácido glucurónico, xilose e manose).



Figura 2.1. Células de *Cryptococcus neoformans* em exame a fresco de LCR de um doente com criptococose, corado com Tinta-da-China, a qual põe em evidência a cápsula (Fotografia do Laboratório de Micologia do IHMT).

São as diferenças na estrutura dos GXM da cápsula que constituem a base para a diferenciação de *C. neoformans* em quatro serotipos: A, B, C e D. Algumas estirpes possuem ainda características de ambos os serotipos A e D, sendo classificados como um quinto serotipo, o serotipo híbrido AD. Tradicionalmente, os cinco serotipos pertenciam a duas variedades, *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A, D e AD) e *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B e C). Posteriormente, Franzot *et al.* (1999), com base em características clínicas, moleculares e biológicas, propuseram a subdivisão de *C. neoformans* var. *neoformans* em duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos D e AD) e *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* foi reconhecido pela primeira vez em 1970 e tem sido diferenciado das restantes variedades por características fenotípicas, habitat natural, epidemiologia, manifestações clínicas e resposta à terapêutica antifúngica. Também as diferenças na sequência nucleotídica do DNA ribossômico (rDNA) destas variedades podem servir para diferenciá-las. Aliás, Boekhout *et al.* (2001) sugeriu que *C. neoformans* var. *gattii* representa uma espécie distinta devido às suas acentuadas divergências moleculares, tendo sido descrita formalmente pouco depois a espécie *Cryptococcus gattii* (Kwon-Chung *et al.* 2002). A classificação taxonómica de *C. neoformans* baseada em estudos sobre a homologia inter- e intraespecífica do DNA e da análise de sequências de RNA ribossômico é actualmente a mais aceite pela comunidade científica e encontra-se esquematizada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Espécies e variedades do complexo *Cryptococcus neoformans*

Espécies	Serotipos
<i>C. neoformans</i>	A (variedade <i>grubii</i>)
	AD (híbrido)
	D (variedade <i>neoformans</i>)
<i>C. gattii</i>	B
	C

Relativamente à sua distribuição geográfica, o serotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*) possui uma distribuição mundial, enquanto o serotipo D (*C. neoformans* var. *neoformans*) predomina nas zonas temperadas do continente europeu. Os serotipos B e C (*C. gattii*) são considerados restritos a países de clima tropical e subtropical. Diferenças na tolerância

térmica das variedades *grubii* e *neoformans* também foram observadas, sendo a segunda mais susceptível às temperaturas mais elevadas.

A descoberta do ciclo de vida completo de *C. neoformans*, em 1975, proporcionou um grande avanço no conhecimento desta levedura. Kwon-Chung verificou que este fungo existia sob dois tipos sexualmente compatíveis que, após cruzamento, produziam um basidiomiceta teleomórfico (Casadevall & Perfect, 1998). A fase teleomórfica, apenas observada em laboratório, foi incluída no género *Filobasidiella*. Foram assim encontrados dois estados perfeitos, ou teleomórficos, de *C. neoformans* nomeadamente, *Filobasidiella neoformans*, associado aos serotipos A e D (Kwon-Chung, 1975), e *Filobasidiella bacillispora*, associada aos serotipos B e C (Kwon-Chung, 1976). Segundo estes autores, a grande diferença existente entre estes dois estados é que a segunda espécie produz basidiósporos de forma globosa e com paredes rugosas enquanto que *Filobasidiella neoformans* apresenta basidiósporos com paredes lisas (Casadevall & Perfect, 1998).

2.2. Ecologia e epidemiologia de *Cryptococcus neoformans*

Se antes de 1980 a criptococose era uma infecção pouco frequente, no início da década de 90, com o aumento do número de casos de SIDA, já era uma micose epidémica em algumas regiões do Globo (Martins, 2001). Na Austrália esta micose ocorria em 5,5% dos indivíduos infectados com VIH (Speed & Dunt 1995) e na França em 4,8 a 7,8% dos indivíduos (Dromer *et al.* 1996). No entanto, esta percentagem revelou-se bastante superior em África, com uma prevalência de 15 a 30% (Clumeck *et al.* 1984; Desmet *et al.* 1989). Dados epidemiológicos mostram também que a doença predomina em indivíduos do sexo masculino e com idade entre 20 a 50 anos (Dromer *et al.* 1996; Fernandes *et al.* 2000; Mirza *et al.* 2003). Embora não haja explicação biológica satisfatória para o predomínio da infecção no sexo masculino, acredita-se que o sistema imunitário e a fisiologia do hospedeiro, assim como diferenças hormonais entre homens e mulheres, possam ser responsáveis por este predomínio (Casadevall & Perfect 1998). Além da SIDA, a criptococose tem sido também descrita em indivíduos com doenças malignas, em tratamento prolongado com corticóides, em transplantados de órgãos, com diabetes e com doenças reumatológicas e pulmonares crónicas (Mitchell & Perfect 1995). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* é o agente etiológico da maior parte das infecções criptococócicas no ser humano e da quase totalidade das infecções em doentes infectados pelo VIH, embora ambas as variedades de *C. neoformans* causem infecções com quadros

clínicos muito semelhantes. A variedade *C. neoformans* var. *gattii* raramente é causa de infecção disseminada em doentes com SIDA, mesmo nas áreas onde é endémica (Abraham *et al.* 1997; Rozenbaum *et al.* 1992; Speed & Dunt 1995). Verificou-se também que a mortalidade é mais elevada nas infecções causadas pela variedade *neoformans* (Fisher *et al.* 1993).

Cryptococcus neoformans é considerada uma espécie cosmopolita, havendo referência desta variedade em quase todos os países do mundo. Os seus habitats naturais mais importantes são os excrementos de pombos e o solo contaminado por eles e por outras aves (Casadevall & Perfect, 1998; Lin & Heitman, 2006). A espécie *C. gatti* é encontrada em zonas mais restritas, predominando em zonas tropicais e sub-tropicais, geralmente associada a várias espécies de eucalipto, nomeadamente *Eucalyptus camaldulensis*, *E. blakely*, e *E. tereticornis*, entre outras espécies, e madeira em decomposição (Casadevall & Perfect, 1998). Infecções humanas com *C. neoformans* var. *neoformans* (com especial ênfase para o serotipo AD) e *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) têm sido relatadas em todos os continentes. O serotipo A é o mais frequente em doentes com SIDA (Mitchell & Perfect 1995; Steenbergen & Casadevall 2000; Sriburee *et al.* 2004), sendo frequentemente encontrado nos Estados Unidos da América, enquanto o serotipo D se encontra com maior frequência em determinadas áreas da Europa, nomeadamente na França (Dromer *et al.* 1996) e Itália (Griseo & Gallo 1997; Tortorano 1997). Recentemente um surto de *C. gattii* foi descrito em Vancouver no Canadá, uma região de clima temperado (Kidd *et al.* 2004). Esta espécie está mais relacionada com infecção em indivíduos imunocompetentes, havendo uma predominância do serotipo B. A criptococose causada por *C. gattii* apresenta-se geralmente associada a ambientes com uma maior distribuição de árvores de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis* (Ellis & Pfeiffer 1992). Na Austrália, onde foi realizado um extenso estudo sobre a epidemiologia desta espécie, o serotipo B predomina entre os isolados clínicos e ambientais (Sorrel *et al.* 1996a, 1996b). Castañon-Olivares *et al.* (2000) demonstraram também a ocorrência de cerca de 10% de *C. gattii* entre os isolados de agentes de criptococose no México.

2.3. Factores de virulência de *Cryptococcus neoformans*

Os vários factores que contribuem para o estabelecimento de uma infecção são designados por factores de virulência. Para que um organismo cause doença deve conseguir entrar no hospedeiro, multiplicar-se nos seus tecidos, resistir aos respectivos mecanismos de defesa e

causar prejuízo ao mesmo. A virulência de um determinado fungo não deve ser atribuída a um único factor, mas a um conjunto de factores que, em conjunto, causam a infecção progressiva. A gravidade da infecção causada por *C. neoformans* em cada indivíduo resulta da combinação dos vários factores de virulência, da quantidade de inóculo e do estado de susceptibilidade imunitária do próprio hospedeiro. Como os indivíduos imunodeprimidos são mais susceptíveis à infecção por esta levedura do que os indivíduos imunocompetentes, a espécie *C. neoformans* é considerada patogénica oportunista.

Foram descritos inúmeros factores de virulência em *C. neoformans*, entre eles a produção da cápsula polissacarídea (Chang & Kwon-Chung 1994), a síntese de melanina (Rhodes *et al.* 1982), a produção de proteases extracelulares (Brueske 1986) e a capacidade de resistir à temperatura de 37 °C (Rhodes *et al.* 1982), entre outros. As estirpes de *C. neoformans* que são isoladas a partir de doentes infectados são capazes de crescer a 37 °C, de produzir a enzima fenoloxidase e são, na maioria das vezes, encapsuladas. Estas serão as propriedades essenciais para definir a virulência da estirpe (Mitchell & Perfect, 1995). Por outro lado, *C. neoformans* demonstra também capacidade de microevolução e *switching* fenotípico após a passagem de *in vivo* para *in vitro* e vice-versa (Lin & Heitman, 2006). A microevolução poderá expressar-se através da modificação do fenótipo e do genótipo das estirpes, enquanto o *switching* fenotípico resulta numa mudança reversível do fenótipo. Este último processo inclui diferenças ao nível da cor e morfologia da colónia, dimensões da cápsula, produção de melanina, taxa de crescimento, virulência no hospedeiro e sensibilidade aos agentes antifúngicos (Lin & Heitman, 2006).

Cápsula polissacarídea

A produção de cápsula polissacarídea foi o primeiro factor de virulência conhecido, que permite distinguir as células de *C. neoformans* de todas as outras leveduras de interesse clínico. Contudo, não há relação entre tamanho da cápsula e a virulência. Têm sido isolados de doentes estirpes com cápsulas muito reduzidas, pois num indivíduo com o sistema imunológico suficientemente debilitado, mesmo as estirpes acapsuladas podem causar doença. No entanto, a presença de cápsula permite ao fungo disseminar-se para o sistema nervoso central e induzir uma resposta celular pulmonar mais significativa. A virulência conferida à levedura pela cápsula pode dever-se às suas propriedades biológicas, sendo a mais importante delas a inibição da fagocitose. A cápsula aumenta ainda a carga negativa das células (Nosanchuck & Casadevall 1997), inibe a migração de leucócitos, inactiva os anticorpos e estimula a formação de edema cerebral. A actividade

antifagocitária da cápsula faz com que a levedura persista nos fluidos corporais e evita que esta seja detectada pelo sistema imunitário (Dong & Murphy 1995). Células acapsuladas da levedura, se cultivadas juntamente com GXM, tornam-se também resistentes à fagocitose, o que indica que esta resistência é directamente mediada pela cápsula. É provável que no estado saprofítico, na Natureza, a cápsula proteja a célula de *C. neoformans* da desidratação e reduza a possibilidade das células serem destruídas por amibas do solo ou por outros agentes agressivos (Neilson *et al.* 1978). A constituição da cápsula baseia-se em polímeros lineares de α -1.3-manano, xilose e ácido glucurónico, sendo baseado em diferenças nesta constituição polissacarídea que se tem vindo a determinar os vários serotipos de *C. neoformans*. Foram identificados pelo menos quatro genes envolvidos na formação da cápsula de *C. neoformans*: *CAP59*, *CAP64*, *CAP60* e *CAP10*. A perda de qualquer um destes genes resulta na incapacidade de sintetizar a cápsula.

Produção de pigmento

Cryptococcus neoformans produz oxidases de compostos fenólicos que convertem uma grande variedade de substratos hidroxibenzóicos, incluindo catecolaminas, em pigmentos castanho escuros do tipo melanina (Polacheck *et al.* 1982; Wang *et al.* 1995). Estes pigmentos podem ajudar a proteger as células da levedura dos efeitos oxidantes antimicrobianos nos tecidos do hospedeiro (Jacobson & Emery 1991; Jacobson *et al.* 1994; Wang *et al.* 1995). A produção de melanina é um importante factor de virulência em *C. neoformans*. A melanina pode proteger o fungo dos radicais livres tóxicos que são produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro, enquanto na natureza protege os fungos contra a radiação ultravioleta. A produção deste pigmento pode usar como substrato neurotransmissores como dopamina e epinefrina, sendo esta uma possível explicação para o tropismo desta levedura pelo sistema nervoso central.

Produção de enzimas

Outro factor de virulência de *C. neoformans* é a produção de enzimas, como as fosfolipases, que são necessárias para o início da infecção pulmonar e para a disseminação da levedura pelas vias linfática e/ou sanguínea do hospedeiro. Provavelmente, estas enzimas actuam pela destruição de componentes das membranas celulares. As DNAses extracelulares produzidas pela levedura degradam o DNA do hospedeiro obtendo-se assim nucleótidos livres.

Termotolerância

As estirpes de *C. neoformans* são capazes de crescer bem à temperatura do corpo dos mamíferos, de 37 °C (Kwon-Chung 1998), podendo suportar temperaturas superiores até um máximo de 40 °C. Este fenótipo é um requisito muito importante na sobrevivência do fungo como parasita (Rhodes *et al.* 1982). Um mutante termossensível revelou-se avirulento em modelo murino (Kwon-Chung *et al.* 1992). Foi já identificada uma via metabólica em que a calcineurina se mostra essencial para o crescimento de *C. neoformans* à temperatura de 37 °C (Odom *et al.* 1997). É possível também que a existência da cápsula contribua para aumentar a capacidade de resistência desta levedura a temperaturas elevadas (Kwon-Chung 1998).

2.4. Importância clínica e manifestações da criptococose

A criptococose manifesta-se geralmente, sob a forma de meningoencefalite podendo surgir, no entanto, em localizações periféricas que eventualmente sugiram uma meningite assintomática e aconselhem uma punção lombar (Martins, 2001). O prognóstico de uma criptococose está directamente ligado ao grau de envolvimento do sistema nervoso. A sintomatologia é variável. Em certos casos pode começar por cefaleias bilaterais vagas, frequentemente associadas a febre (Vandepitte 1990). Após algumas semanas de evolução, surgem gradualmente náuseas, vertigens, irritabilidade e confusão mental (Dismukes 1988). Na ausência de diagnóstico, os sintomas agravam-se e podem desencadear alterações da visão, audição, crises convulsivas ou coma (Denning *et al.* 1991).

A pneumopatia provocada por *C. neoformans* raramente surge em primeiro plano (Cameron *et al.* 1991). Na maioria dos casos, a sintomatologia presente não é muito específica, incluindo tosse com ou sem expectoração, dor torácica vaga e febre moderada ou ausente. Muitas vezes o diagnóstico é feito após a evolução para uma meningite criptocócica. Numa pequena percentagem de casos pode ocorrer disseminação hematogénea do agente para outras localizações, nomeadamente para a pele (Bettoli *et al.* 1993; Murakawa *et al.* 1996), ossos (Gurevitz *et al.* 1994) e localizações oculares (Schepelmann *et al.* 1993), renais, supra-renais, prostáticas, ganglionares, pancreáticas e hepáticas, entre outras.

O processo de disseminação de *C. neoformans* não é ainda totalmente compreendido, embora a forma infectante seja provavelmente a inalação de basidiósporos ou de células fúngicas desidratadas. Estas células possuem dimensões de aproximadamente um a dois

micrometros, o que lhes permite a entrada nos alvéolos pulmonares. O esquema da Figura 2.2 descreve o percurso provável deste microrganismo desde o seu habitat natural, no ambiente, até produzir infecção no homem ou em animais.



Figura 2.2. Percurso provável da disseminação de *Cryptococcus neoformans* como agente etiológico da criptococose (Adaptado de <http://www.bmolchem.wisc.edu/labs/hull/research.html>)

Considera-se assim que a infecção tem início nos pulmões após a inalação de partículas fúngicas. Entre as evidências para este facto encontra-se a identificação de fezes de aves como reservatório ambiental e a descoberta, nestas, de partículas infecciosas com tamanho compatível com a deposição alveolar. Contudo, crê-se igualmente que *C. neoformans* possa colonizar o tracto respiratório sem causar infecção (Lin & Heitman, 2006). Inicialmente a infecção pode ser tipicamente assintomática e manter-se de forma latente. Assim que o sistema imunitário do hospedeiro é comprometido, este estado pode ser reactivado e dar origem a uma infecção sistémica (Lin & Heitman, 2006). O fungo pode migrar para outras partes do corpo mas apresenta um acentuado tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), onde pode causar meningite, meningoencefalite e encefalite. Contudo, num cenário de imunodeficiência, a forma pulmonar também pode ocorrer. No SNC o fungo encontra um meio propício ao seu desenvolvimento, uma vez que no líquido cefalorraquidiano (LCR) existem elevadas concentrações de nutrientes assimiláveis pelo fungo, tais como tiamina, glutamato, glutamina, hidratos de carbono e minerais. Ainda ao

nível do LCR, o fungo encontra uma menor resistência imunológica por parte do hospedeiro, uma vez que a resposta inflamatória no tecido cerebral é menor do que em outros tecidos. Por outro lado, o cérebro é abundante em catecolaminas, que podem ser usadas pelo fungo para síntese de melanina.

Algumas características importantes permitem diferenciar as infecções causadas por *C. neoformans* daquelas causadas por *C. gattii*. Assim, a hidrocefalia e lesões cerebrais focais são mais comuns em infecções causadas por *C. gattii*. Na infecção causada por *C. gattii* também é observada uma maior incidência de criptococomas no pulmão e cérebro e uma resposta mais lenta aos antifúngicos. Um tipo de manifestação menos comum, que atinge cerca de 10 a 15% dos doentes, é a criptococose cutânea. Este tipo de infecção é prevalente no norte da Europa e tem sido relacionada com o serotipo D. Menos frequentemente, pode desenvolver-se criptococose óssea e criptococose do tracto genital. Em doentes cuja infecção se dissemina por todo o organismo, *C. neoformans* pode também ser isolado a partir de urina.

3. Métodos de diagnóstico laboratorial e identificação de *Cryptococcus neoformans*

De um modo geral o diagnóstico da criptococose baseia-se na pesquisa directa do agente nos produtos biológicos e na pesquisa do antígeno circulante. A pesquisa directa do agente inclui a observação de células leveduriformes no exame microscópico dos produtos infectados e o isolamento da levedura após cultura. A identificação de *C. neoformans* requer a realização de testes fisiológicos, incluindo o crescimento a 37 °C, provas de assimilação e utilização de açúcares e de outros compostos, como o inositol, a assimilação de creatinina, produção de urease, entre outros. O diagnóstico laboratorial convencional da criptococose baseia-se assim em três testes fundamentais e complementares entre si: (i) Observação da levedura no material clínico; (ii) Isolamento em cultura seguido de provas bioquímicas para a sua identificação; e (iii) pesquisa de antígenos circulantes.

3.1. Diagnóstico convencional

3.1.1. Exame directo das amostras

Podem ser várias as técnicas empregues para a pesquisa de estruturas fúngicas características de *C. neoformans* e *C. gattii*. Segundo Martins (2001), em situações de urgência, a observação directa da sua forma *in vivo*, de células encapsuladas na amostra, constitui uma informação fundamental no diagnóstico convencional desta levedura (Figura 3.1).

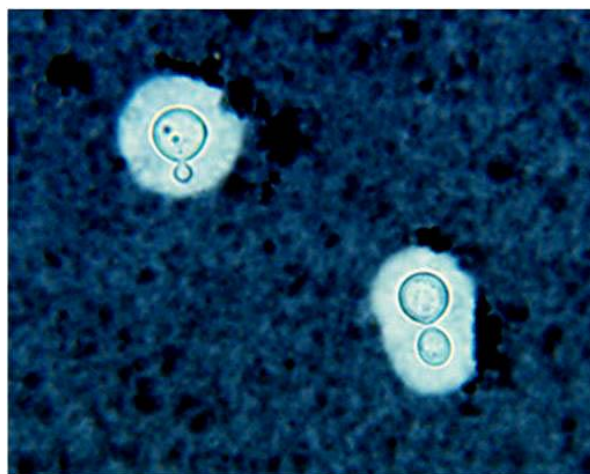


Figura 3.1. Exame directo *in vivo*, de células encapsuladas de *C.neoformans* (Fotografia do Laboratório de Micologia do IHMT).

A visualização microscópica da cápsula polissacarídea de *C. neoformans* é feita em preparações com Tinta-da-China (diluída 1:3) que conferem um contraste negativo, permitindo a identificação de um halo claro à volta da célula. A cápsula afasta as partículas da tinta, permitindo a observação da cápsula incolor. A preparação deve ser feita a partir de uma gota do sedimento obtido após a centrifugação da amostra clínica, preferencialmente de líquido cefalorraquidiano, podendo também ser feita a partir de urina, expectoração, lavado bronco-alveolar (LBA), pus de lesões muco-cutâneas, macerados de tecidos obtidos por biópsia, secreção prostática, sangue e punção de medula óssea. Nestas preparações, a levedura apresenta-se como uma célula globosa ou em forma ligeiramente ovalada com uma cápsula polissacarídea. A pesquisa de *C. neoformans* em tecidos é feita com corantes específicos como a prata, tendo como principal objectivo a visualização de células leveduriformes de *C. neoformans* e de *C. gattii* que se destacam através de um halo branco que consiste na cápsula, como referido anteriormente. As preparações devem ser observadas ao microscópio com baixa luminosidade para aumentar o contraste.

É frequente observarem-se leucócitos que podem também exibir um halo semelhante às cápsulas de *C. neoformans*, podendo ser confundidos com este e dando origem a falsos positivos. A visualização de estirpes acapsuladas é mais difícil. Por vezes a cápsula é tão pequena que é de difícil observação, podendo confundir-se *C. neoformans* com outras leveduras que, excepcionalmente, podem ser também responsáveis por meningites, como as pertencentes ao género *Candida*. Nas amostras de pus, de expectoração ou de tecido é sempre conveniente fazer a digestão da amostra com hidróxido de potássio a 20%, com o intuito de remover artefactos e clarificar a preparação.

A pesquisa directa de *C. neoformans* fornece um diagnóstico rápido, pouco dispendioso e muito útil ao clínico, especialmente na confirmação da suspeita de meningite criptocócica. A sensibilidade analítica deste método é de 1000 a 10000 células por mL. Em função da elevada carga de leveduras verificada em amostras de doentes com SIDA, a sensibilidade deste teste alcança 80% dos casos positivos de meningite criptocócica. Já em indivíduos imunocompetentes, esta percentagem cai para 30-50%. O exame directo não é recomendado como procedimento de rotina em doentes que não estão infectados com VIH, uma vez que a percentagem de exames positivos é inferior a 50%, devendo ser substituído pela cultura do LCR e pelo teste de aglutinação com partículas de látex.

3.1.2. Detecção do antígeno criptocócico

A detecção do antígeno criptocócico é feita por aglutinação de partículas de latex sensibilizadas com anticorpos específicos (Figura 3.2). Há muitos testes comercializados, nomeadamente os Pastorex Crypto Plus® - Diagnostics Pasteur, Crypto-LA Test® - Fumouze, e CALAS® - Meridian. Todos estes testes têm uma excelente sensibilidade e especificidade, embora nem todos incluam controlos negativos e alguns não utilizem a enzima proteolítica pronase, que permite melhorar a sensibilidade e a especificidade até cerca de 95% (Martins, 2001).

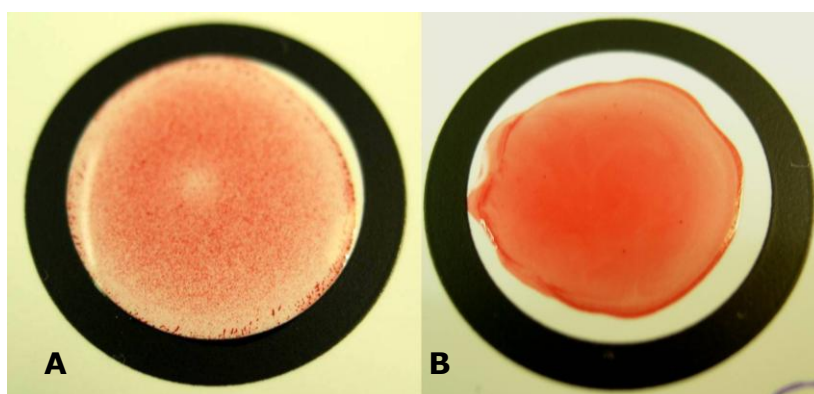


Figura 3.2. Teste de aglutinação para detecção de antígeno circulante de *C. neoformans*. Resultado positivo (A) e negativo (B) (Fotografia do Laboratório de Micologia do IHMT).

Os testes que utilizam a técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) têm a vantagem de permitir analisar mais rapidamente um número elevado de amostras. No entanto, estes testes perdem sensibilidade quando os títulos dos antígenos são elevados. Deste modo, tem-se revelado mais útil avaliar a progressão da infecção vs sucesso terapêutico com testes de aglutinação. Há toda a conveniência que seja utilizado sempre o mesmo teste no acompanhamento de um doente, pois podem verificar-se variações antigénicas significativas com uma mesma amostra utilizando testes diferentes. Existem variadas causas que poderão originar resultados falsos positivos (Blevins *et al.* 1995; Engler & Shea 1994; Whittier *et al.* 1994). Podem estar relacionadas com a presença de factor reumatóide, contaminação da pipeta, desinfetantes ou detergentes utilizados na limpeza das lâminas de vidro ou devidas a infecções causadas por outros fungos com reactividade cruzada, como *Trichosporon beigelli* e, potencialmente, outras espécies de

Cryptococcus (Blevins *et al.* 1995). Os falsos negativos estão relacionados com a não utilização da enzima pronase (Hoffmann *et al.* 1991) ou com os fenómenos raros de prozona que necessitam de uma diluição da amostra para objectivar a positividade e para os quais a pronase é ineficaz (Hamilton *et al.* 1991). Deste modo, nos casos em que há suspeita de criptococose é fundamental fazer várias diluições de todas as amostras negativas.

A não diminuição dos títulos no LCR ou o seu aumento durante um tratamento em fase aguda estão quase sempre relacionados com a ineficácia da terapêutica. Do mesmo modo, o aumento do título durante uma terapêutica de manutenção é um forte indicador de recidiva. Apesar das limitações da técnica, a pesquisa sistemática do antígeno criptocócico tem-se revelado útil no diagnóstico precoce de criptococose nos doentes com SIDA. Nestes doentes, o antígeno criptocócico pode ser detectado em praticamente 100% dos casos. Contudo, nos doentes imunocompetentes a detecção do antígeno só é positiva em cerca de 60% dos casos de infecção criptocócica confirmada por outros métodos. Sob o ponto de vista terapêutico, Powderly *et al.* (1994) consideram que a importância de uma modificação dos títulos antigénicos durante o curso de uma infecção é muito discutível. Para estes autores, as modificações observadas no soro dos doentes com SIDA não se correlacionam com a evolução da infecção.

3.1.3. Isolamento em cultura e identificação

Após a observação do exame directo da amostra biológica, o restante sedimento obtido da centrifugação do LCR é inoculado em meio de Sabouraud em tubo e incubado a 30 – 35 °C. A cultura desta levedura é relativamente fácil de obter em todos os meios habitualmente utilizados para fungos (Martins, 2001), como o meio de Sabouraud dextrose agar, onde forma colónias cremosas, mucóides, esbranquiçadas ou de cor creme, em três a cinco dias após a inoculação (Figura 3.3A), excepto na presença de cicloheximida. O crescimento de *Cryptococcus* é impedido em meios com cicloheximida, pois concentrações acima de 25 µg/ml inibem a maioria dos isolados (Casadevall & Perfect, 1998). Segundo Martins (2001), para o isolamento de *C. neoformans* a partir de produtos biológicos habitualmente contaminados (p.e. expectoração, urina) é conveniente a adição de compostos antibacterianos (cloranfenicol e/ou gentamicina) ao meio de cultura para inibir o crescimento de bactérias. A mucosidade da colónia depende da cápsula da estirpe: quanto maior for a cápsula, mais mucóide é a colónia.

Para o isolamento de *C. neoformans* a partir de produtos biológicos habitualmente contaminados, como amostras do tracto respiratório, urina ou amostras ambientais, são usados meios especiais, que são selectivos e diferenciais, como é o caso do meio de “Staib” ou “Niger seed” agar (*Guizotia abyssinica*) (Figura 3.3B), contendo ácido cafeico, ou o meio de “Pal”, que utiliza um extracto aquoso de sementes de girassol (*Helianthus annuus*). Nestes meios, *C. neoformans* é capaz de sintetizar a enzima fenoloxidase que catalisa a oxidação de substratos difenólicos em produtos semelhantes à melanina. Estes meios fazem com que as colónias desta levedura adquiram uma cor acastanhada, permitindo a sua diferenciação de outras leveduras tais como *Candida* spp., ou mesmo de outras espécies de *Cryptococcus* como *C. laurentii*. É também conveniente a adição de compostos antibacterianos (cloramfenicol e/ou gentamicina) ao meio de cultura para impedir o crescimento de bactérias. Relativamente ao tipo de produto biológico passível de ser analisado por este meio, a fim de se obter o isolamento do fungo, somente o sangue constitui excepção, como aliás acontece para as outras micoses profundas. É de realçar que as hemoculturas positivas correspondem a um mau prognóstico e estão associadas a uma mortalidade muito elevada.

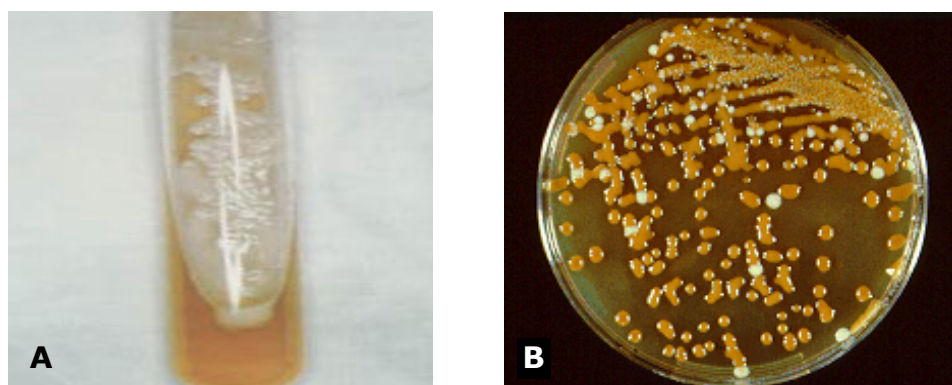


Figura 3.3. (A) Colónias cremosas e mucóides de *C. neoformans* em cultura após 5 dias de incubação em meio de Sabouraud; (B) Cultura mista de *Candida* sp. e *C. neoformans* em meio de Staib. As colónias acastanhadas são de *C. neoformans* pois somente esta espécie produz melanina (Fotografias do Laboratório de Micologia do IHMT)..

De uma forma geral, *C. neoformans* tem capacidade de se multiplicar a 25 °C e a 37 °C e as colónias tornam-se visíveis ao fim de 48 a 72 horas de incubação em meio de agar de Sabouraud. Nas primoculturas, o período pode ser mais longo, chegando a 12 a 14 dias ou

mesmo até três semanas. A inoculação do sedimento obtido após centrifugação de um volume significativo de LCR (3 - 5 ml) aumenta a probabilidade de obtenção de culturas positivas. No caso de *C. gattii*, as culturas são habitualmente de crescimento mais lento pois requerem cerca de 5 a 7 dias à temperatura de 25 - 30°C para as colónias se tornarem visíveis. À temperatura da 37 °C esta variedade cresce com dificuldade. Uma cultura só deve ser descartada como negativa após 15 dias de incubação. A sensibilidade verificada na cultura é de 75% pois em certas situações, como por exemplo na meningite criptocócica crónica, o LCR pode resultar em cultura negativa devido à pequena carga de microrganismos viáveis. A baixa na concentração de microrganismos viáveis é devida, nestes casos, a tratamento prévio e torna-se um problema na monitorização dos doentes crónicos.

A identificação da estirpe purificada é feita com base em testes de assimilação de diferentes compostos e no teste da urease. Para este efeito são habitualmente usados *kits* comerciais (como por exemplo as galerias API) ou mesmo sistemas automatizados utilizados na identificação das restantes leveduras de interesse clínico. Mas, enquanto que nos laboratórios de diagnóstico dos hospitais com grande número de amostras por dia, se utilizam meios automatizados, nos laboratórios mais pequenos é mais comum a utilização de *kits* comerciais que se baseiam na análise das propriedades fisiológicas desta levedura para a diferenciar das restantes.

3.1.4. Outros métodos de diagnóstico

A visualização *in vivo* de *C. neoformans* nos tecidos, tais como, biópsias de pele, pulmão e osso, pode ser feita através de coloração, seguida da visualização microscópica. As técnicas de coloração mais utilizadas são Gomori-Grocott, PAS (*Periodic Acid Schiff*), hematoxilina-eosina, Gram e mucicarmina. Habitualmente, as células de *C. neoformans* têm forma globosa nos tecidos, podendo eventualmente apresentar-se com forma oval, e não induzem reacção tecidular. As células de *C. gattii* têm em geral forma mais alongada. No entanto, durante os processos de coloração as amostras são desidratadas, fixadas ao calor e coradas e as células podem rebentar ou diminuir de tamanho o que dificulta a sua identificação. A alteração da morfologia das células é frequente nas preparações histológicas e torna-se possível confundir as células de *C. neoformans* com as de outros fungos, nomeadamente com as de *Blastomyces dermatitidis*.

As técnicas imagiológicas, tomografia axial computadorizada (TAC) e ressonância magnética nuclear (RMN), podem ser usadas no diagnóstico do envolvimento meningoencefálico, nomeadamente para a detecção de complicações como a hidrocefalia, lesão ocupando espaço, atrofia cortical difusa ou edema cerebral. Quando há suspeita clínica, a radiografia do tórax permite o diagnóstico em mais de 50% dos casos, apesar da ausência de especificidade das lesões observadas.

Espécies do género *Cryptococcus* são, geralmente, consideradas como leveduras não fermentativas, que assimilam inositol e produzem urease. A produção de urease é uma prova bioquímica utilizada para identificação do género, pois as espécies de *Cryptococcus* são capazes de realizar hidrólise da ureia. Este fungo tem a capacidade de produzir urease em 15 min, enquanto outras leveduras urease positivas necessitam de mais de três horas para que demonstrem essa actividade (Casadevall & Perfect, 1998). Embora esta característica tenha vindo a ser utilizada no diagnóstico rápido desta levedura, apenas a variedade *neoformans* tem uma reacção positiva ao fim desse tempo, sendo *C. gattii* mais lenta (Martins, 2001). A urease é inibida pela presença de EDTA em *C. gattii*, mas não em *C. neoformans*.

3.1.5. Serotipagem

A classificação dos serotipos baseia-se nas diferenças antigénicas das estirpes de *C. neoformans* quando as células são colocadas em presença de anticorpos específicos (Ikeda *et al.* 1985). A definição dos três primeiros serotipos (A, B e C) foi baseada em reacções de aglutinação e precipitação em soro imunizado de coelho (Evans 1949, 1950; Evans & Kessell 1951). Mais tarde, Wilson *et al.* (1968) descreveram o serotipo D. O quinto serotipo (AD) foi descrito por Ikeda *et al.* (1985) e inclui o conjunto de estirpes que têm determinantes antigénicos comuns aos serotipos A e D. Foram desenvolvidos diferentes métodos para a determinação dos serotipos de *C. neoformans*, tais como os que envolviam reacções de aglutinação, reacções capsulares, imunoprecipitação e imunofluorescência (Evans 1960; Ikeda *et al.* 1996; Kaplan *et al.* 1981; Wilson *et al.* 1968).

3.2. Diagnóstico molecular de *Cryptococcus neoformans*

A maioria dos métodos moleculares de diagnóstico e de tipagem de *C. neoformans* tem por base a técnica de PCR, pois para além desta técnica ser muito válida principalmente na sua facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade, é particularmente útil em estudos

genético-moleculares permitindo estudar um grande número de amostras. Esta técnica permite a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima polimerase de DNA e de *primers* específicos (Antonini *et al.* 2004; Raton, 2004). Vários métodos moleculares baseados em PCR têm sido utilizados na caracterização e identificação de *C. neoformans* assim como em estudos epidemiológicos: PCR multiplex, *nested* PCR, PCR em tempo real, AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphism*), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphisms*, baseado no gene *URA5* e *PLB1*), entre muitas outras técnicas (Martins, 2001). Muitas destas técnicas permitem gerar diferentes padrões de amplificação os quais possibilitam, no caso específico de *C. neoformans*, discriminar variedades e tipos moleculares. Tanaka *et al.* (1996) identificaram *C. neoformans* a partir de amostras clínicas de doentes com criptococose pulmonar através de um método envolvendo duas reacções de PCR sucessivas (*nested* PCR), que permitem a amplificação de DNA que esteja numa concentração relativamente baixa. Rappelli e colaboradores (1998) desenvolveram um método que permitiu a identificação de *C. neoformans* a partir de LCR de doentes com meningite criptocócica. Esta metodologia revelou-se bastante sensível, pois permitiu detectar DNA de *C. neoformans* no produto infectado com um reduzido número de células leveduriformes por mililitro. A escolha dos *primers* e a sua localização podem permitir uma amplificação característica de uma única espécie, grupo de espécies próximas ou género. Também a utilização de tecnologias isotérmicas de amplificação de DNA, como o LAMP (*Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification*) têm sido desenvolvidas para a identificação de *C. neoformans* (Lucas *et al.* 2010). Para além dos métodos de detecção directa de *C. neoformans* por PCR, vários outros métodos têm sido descritos que fazem uso de PCR em combinação com outras técnicas, em que o produto de amplificação é utilizado como sonda para uma hibridação específica (Cogliati *et al.* 2000; Evertsson *et al.* 2000) ou é sujeito à acção de enzimas de restrição que conduzem a perfis específicos (Chen *et al.* 2000; Hopfer *et al.* 1993). São também utilizadas na caracterização e identificação molecular de *C. neoformans*, a hibridação por *Southern blot* com sondas de sequências repetitivas de DNA do microrganismo (Varma *et al.* 1995) e hibridação *in situ* que, utilizando sondas de DNA fluorescentes (FISH – *Fluorescence In Situ Hybridization*), possibilita a detecção de sequências alvo localizadas no rRNA de células intactas (Martins *et al.* 2010).

Embora estas técnicas moleculares permitam a realização de um diagnóstico simples, rápido e reprodutível, estas metodologias tem a desvantagem de dificilmente serem quantitativas, de apenas permitirem a detecção dos microrganismos para os quais se utilizam *primers* ou sondas específicos, para além de outros problemas associados à eficácia na amplificação directa do DNA por PCR a partir de amostras biológicas. Deste modo, os métodos convencionais e os moleculares devem ser encarados como complementares entre si no diagnóstico de fungos patogénicos, incluindo da criptococose.

3.3. Epidemiologia molecular de *Cryptococcus neoformans*

Os procedimentos de tipagem molecular têm sido úteis na caracterização molecular de diferentes microrganismos infecciosos no ser humano e no conhecimento da ecologia e epidemiologia da infecção criptocócica, na tentativa de responder questões relacionadas com a patogénese do fungo, com a detecção de epidemias, com a distinção de infecção primária ou recidiva e a tentativa de relacionar o isolado com a fonte de infecção. A variabilidade genética existente entre os isolados de uma determinada espécie é importante porque pode interferir com a variabilidade fenotípica, com a diferença na virulência ou na susceptibilidade aos agentes terapêuticos (Franzot *et al.* 1997).

Métodos de tipagem molecular, incluindo *Random amplification of polymorphic DNA* (RAPD), *Polymerase chain reaction (PCR) fingerprinting*, *Restriction fragment length polymorphism* (RFLPs), hibridização por *Southern blot*, cariotipagem eletroforética do DNA entre outros, têm sido utilizados com o intuito de caracterizar isolados de *C. neoformans* em estudos epidemiológicos (Perfect, *et al.* 1993; Dromer *et al.* 1994; Varma *et al.* 1995; Brandt *et al.* 1996; Franzot *et al.* 1997; Cogliati *et al.* 2000; Garcia-Hermoso *et al.* 2001; Boekhout *et al.* 2001). Cada uma destas técnicas tem mostrado uma evidente heterogenidade genética entre os isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* dentro de uma área geográfica restrita.

A técnica de RFLP é utilizada para diferenciar microrganismos pelos padrões derivados da clivagem de seu DNA, cujos comprimentos dos fragmentos produzidos podem diferir quando o DNA é digerido com diferentes enzimas de restrição. A similaridade dos padrões obtidos pode ser usada para diferenciar espécies e, até, estirpes de uma mesma espécie. A aplicação da técnica de RFLP foi por exemplo utilizada por Franzot *et al.* (1997) para caracterizar 51 isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans* em duas cidades do Brasil e também isolados de Nova Iorque. Estes investigadores mostraram que alguns isolados do

Brasil e de Nova Iorque estão estreitamente relacionados, sugerindo uma dispersão global de certos isolados.

Numa versão de PCR *fingerprinting*, são utilizados oligonucleotídeos iniciadores que são específicos para sequências microssatélites/minissatélites ou para sequências repetitivas hipervariáveis de *C. neoformans*, permitindo que os isolados sejam tipados com sensibilidade suficiente para detectar diferenças inter- e intra-variedades. Utilizando por exemplo os oligonucleótidos iniciadores (GACA)₄, para regiões microssatélites, e M13, para uma região minissatélite, a amplificação do DNA de *C. neoformans* resulta em produtos que variam de 500 a 2500 pb em tamanho (Meyer *et al.* 1999). Meyer *et al.* 2003 utilizaram estes dois *primers* para investigar a diversidade global de *C. neoformans* e seus resultados permitiram agrupar os isolados clínicos e ambientais em oito tipos de padrões moleculares principais: VNI (correspondente a *C. neoformans* var. *grubii*, serótipo A); VNII (também correspondente a *C. neoformans* var. *grubii*, serótipo A); VNIII (estirpes híbridas de serótipo A/D); VNIV (correspondente a *C. neoformans* var. *neoformans*, serótipo D); e VGI, VGII, VGIII e VGIV (correspondentes a *C. neoformans* var. *gattii*, serótipos B e C). Estes tipos moleculares foram também confirmados por análise de RFLP utilizando os genes *URA 5* e *PLB1* (Latouche *et al.* 2003; Meyer *et al.* 2003). Os genótipos VNI e VGI são predominantes mundialmente para *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *gattii*, respectivamente. Em infecções em pacientes com VIH verifica-se um predomínio dos genótipos VNI e VNIV.

4. Materiais e métodos

4.1. Estirpes estudadas

Neste estudo foram estudadas 177 estirpes de *C. neoformans* de várias proveniências, incluindo um conjunto de oito estirpes de referência representativas de cada tipo molecular de *C. neoformans* e de *C. gattii* (de acordo com Meyer *et. al.* 2003). Estas estirpes de referência foram as seguintes: WM 148 (Serotipo A, tipo molecular VNI), WM 626 (Serotipo A, VNII), WM 628 (Serotipo AD, VNIII), WM 629 (Serotipo D, VNIV), WM 179 (Serotipo B, VGI), WM 178 (Serotipo B, VGII), WM 161 (Serotipo B, VGIII), e WM 779 (Serotipo C, VGIV) (Tabela 5.1). Adicionalmente, foram estudadas mais sete estirpes de referência obtidas da *Portuguese Yeast Culture Collection* (PYCC, Caparica, Portugal), incluindo a estirpe tipo de *C. neoformans* (Tabela 5.1). Foram estudados 135 isolados clínicos de *C. neoformans* obtidos a partir de amostras biológicas, principalmente de LCR e de hemoculturas, provenientes de doentes distintos com criptococose internados em Unidades de Infecçiology de várias unidades hospitalares, principalmente Portuguesas e da região da Grande Lisboa (Tabela 5.2). Estas estirpes foram isoladas no período de 1991 a 2007 no Laboratório de Micologia do IHMT/UNL a partir dos produtos biológicos infectados provenientes do Hospital de Egas Moniz, Hospital Militar de Belém, Hospital Prisional de Caxias, Hospital de Cascais, Hospital Curry Cabral, Hospital Santa Maria, Hospital Santo António, Centro Hospitalar de Coimbra, República da Guiné-Bissau e República de Angola. Foram também incluídos neste estudo 27 isolados ambientais obtidos a partir de fezes de pombo e de material vegetal (Tabela 5.3). Todos os isolados foram mantidos a 4 °C em Sabouraud dextrose agar até à realização do estudo. Para períodos de armazenamento mais longos das culturas, as mesmas foram congeladas em meio com glicerol a - 70°C. Todos os isolados foram previamente identificados como *C. neoformans* através de métodos convencionais de diagnóstico no laboratório de Micologia do IHMT/UNL. As estirpes são também mantidas neste laboratório.

4.2. Extração de DNA genómico

Os isolados de *C. neoformans* foram crescidos durante 2 - 5 dias a 25 °C em meio Sabouraud. Em seguida, partindo de um inóculo forte, as células foram lavadas, centrifugadas e posteriormente congeladas a - 80 °C durante 45 minutos, ou a - 20 °C durante 60 minutos, de modo a rebentar as células. São adicionados ao sedimento 250 µl

de TE Fenol (solução saturada com 10 ml Tris-HCl, pH8; EDTA 1mM; a fase de fenol está a pH 6.7), 250 µl de clorofórmio e 500 µl tampão de lise (NaCl 1 M, Tris-HCl 1 M, pH8, EDTA 10 mM, pH8, SDS 10%, Triton X-100). A suspensão é agitada no vortex, centrifugando-se novamente em seguida. Adiciona-se 400 µl do sobrenadante obtido a 1 ml de etanol absoluto (para precipitar o DNA). Os tubos são colocados a - 80°C durante 45 minutos, após o que se centrifuga, descarta-se o sobrenadante e seca-se o sedimento para remoção de todo o etanol. Finalmente, o sedimento é dissolvido em TE (Tris-HCl 1 M, EDTA 10 mM, pH8) a 55 °C durante 15 minutos. Posteriormente, o DNA assim extraído foi diluído (1:50) em água bidestilada esterilizada para se proceder às reacções de PCR.

4.3. RFLP do gene *URA5*

A técnica de RFLP do gene *URA5* foi realizada de acordo com o descrito por Meyer *et al.* (2003). Brevemente, para a amplificação do gene *URA5* por PCR, as misturas reacionais continham cerca de 50 ng de DNA, tampão de PCR 1x, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, uma unidade de *Taq* polimerase e 50 ng de cada um dos *primers* (*URA5f*, 5-ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC G-3'; e *URA5r*, 5'-TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC-3'). As reacções de amplificação compreenderam os seguintes passos: desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 1 minuto a 61 °C e 2 minutos a 72 °C, seguido de um passo de extensão final a 72 °C durante 10 minutos. As reacções foram realizadas num termociclador UnoII Thermal Cycler (Biometra). Após as reacções de amplificação foi feita a confirmação da existência de produto amplificado por meio de uma electroforese em gel de agarose (Gibco, BRL, Reino Unido) a 1%, corado com GelRed[®] incorporado de acordo com as instruções do fabricante. Ao produto da reacção de PCR foi adicionada solução de deposição – tampão azul de bromofenol (30% p/v glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 2 mM de EDTA). Em cada gel foi usado o marcador de pesos moleculares GeneRuler[™] 100 bp (FERMENTAS, Canada). A electroforese decorreu a 100 V em tampão TBE 0,5x, durante 30 minutos, utilizando-se o Agarose Gel Electrophoresis System (BIORAD, Franca) para o efeito. As bandas de DNA foram visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens captadas num aparelho UVIdoc (UviTec, Reino Unido). Os produtos de PCR foram digeridos simultaneamente com duas enzimas de restrição, a 37 °C durante toda a noite: *SAU96I* e *HhaI* (New England BioLabs), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos digeridos foram separados em gel de electroforese a 3% a 50 V durante 270 minutos. Os

perfis obtidos foram comparados visualmente com os padrões obtidos com as estirpes de referência de *C. neoformans* e *C. gattii* (de acordo com Meyer *et al.* 2003), com o intuito de identificar o tipo molecular de cada isolado.

4.4. Análise dos perfis electroforéticos e dendrogramas

Os padrões electroforéticos obtidos foram comparados com os perfis das estirpes de referência e analisados por métodos numéricos. As semelhanças entre os vários perfis foram estimadas com o coeficiente de Pearson e os agrupamentos formados utilizando o método UPGMA (GelCompar, versão 1.01, Applied Maths).

5. Resultados

5.1. Estirpes estudadas

Neste trabalho foram estudadas 177 estirpes de *C. neoformans* e de *C. gattii* de várias proveniências, incluindo estirpes de referência usadas para comparação dos resultados (Tabela 5.1). Do total de estirpes, cerca de 76% foram isoladas a partir de produtos biológicos infectados (Tabela 5.2) e cerca de 15% a partir de amostras de origem ambiental (Tabela 5.3). Todas as estirpes foram estudadas no que diz respeito à morfologia macroscópica das colónias obtidas em meio sólido e à morfologia microscópica das células. Quando foram cultivadas em meio de Sabouraud, a maioria das estirpes desenvolveu colónias opacas, planas, de margem lisa e secas, pastosas ou mucosas.

Tabela 5.1. Estirpes de referência utilizadas, respectiva origem, serótipo e tipo molecular

Estirpe	Origem	Serótipo ¹	Tipo molecular ²
133 (= PYCC 3529; CBS 880)	Madeira de ulmeiro, USA	-	VN1
135 (= PYCC 3555; CBS 887)	Solo, Rússia	A	VN1
138 (= PYCC 4208; CBS 6886)	Fezes de Pombo, Dinamarca	AD	VN3
139 (= PYCC 5025)	Eucalipto, Austrália	B	VG3
149 (= PYCC 5026)	Eucalipto, Australia	B	VG3
151 (= PYCC 5028)	Eucalipto, Australia	B	VG2
137 ^T (= PYCC 3957 ^T ; CBS 132 ^T)	Sumo de fruta fermentado	D	VN3
WM 148 (= CBS 10085)	LCR, Austrália	A	VN1
WM 626 (= CBS 10084)	LCR, Austrália	A	VN2
WM 629 (= CBS 10079)	Sangue, Austrália	D	VN4
WM 628 (= CBS 10080)	LCR, Austrália	AD	VN3
WM 179 (= CBS 10078)	Homem, Austrália	B	VG1
WM 178 (= CBS 10082)	Pulmões, Austrália	B	VG2
WM 161 (= CBS 10081)	Eucalipto, USA	B	VG3
WM 779 (= CBS 10101)	África do Sul	C	VG4

¹De acordo com Martins (2001); ²Determinado por RFLP do gene *URA5*, de acordo com Meyer *et al.* (2003); PYCC – *Portuguese Yeast Culture Collection*, Caparica, Portugal; CBS – *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, The Netherlands; WM – *Molecular Mycology Research Laboratory*, University of Sydney at Westmead Hospital, Westmead, Australia; T – Estirpe tipo; LCR – Líquido cefalorraquidiano [Nota: Parte dos tipos moleculares apresentados nesta tabela foram determinados pela Dra. Ana Paula Maduro, IHMT/UNL]

Tabela 5.2. Estirpes de origem clínica utilizadas e respectivas amostras biológicas, sexo e idade dos doentes e hospitais de origem, data de isolamento, serótipo e tipo molecular

Nº. Estirpe	Amostra	Sexo	Idade	Hospital	Data ¹	Serótipo ²	Tipo Molecular ³
1	LCR	F	23	HEM	1991	-	VN4
4	LCR	M	36	Guiné-Bissau	1992	A	VN1
5	Pele	M	35	HEM	1993	-	VN1
7	LCR	M	21	HEM	1994	-	VN1
10	LCR	M	37	HEM	1994	-	VN1
11	LCR	M	27	HPC	1994	-	VN4
12	LCR	M	34	HEM	1994	-	VN3
15	LCR	M	85	IPO	2006	-	VN1
16	LCR	M	39	HEM	1995	-	VN3
18	LCR	M	26	HEM	1995	-	VN1
20	LCR	M	79	HPC	1995	-	VN1
21	LCR	M	32	HEM	1995	-	VN3
24	LCR	M	32	HSM	1995	A	VN2
25	LCR	M	27	HSM	1995	-	VN3
26	Sangue	M	36	HSM	1995	-	VN1
27	LCR	M	23	Angola	1995	A	VN1
29	LCR	M	29	HEM	1995	-	VN3
31	LCR	M	52	HSM	1995	-	VN1
33	LCR	M	26	HCC	1995	-	VN1
34	LCR	M	49	HMB	1995	A	VN1
36	LCR	M	22	HEM	1996	-	VN4
37	LCR	F	31	HCC	1996	-	VN1
39	LCR	M	27	HSM	1996	-	VN1
40	LCR	M	39	HSM	1996	AD	VN3
43	LCR	-	-	IHMT	1996	A	VN3
44	-	-	-	IHMT	1996	-	VN1
46	-	-	-	IHMT	1996	-	VN1
47	-	-	-	IHMT	1996	-	VN3

Tabela 5.2. (Cont.)

Nº. Estirpe	Amostra	Sexo	Idade	Hospital	Data ¹	Serótipo ²	Tipo Molecular ³
48	Pele	M	50	HCC	1996	D	VN3
49	LCR	M	31	HSM	1996	AD	VN3
51	LCR	M	25	HC	1996	-	VN3
53	LCR	M	36	HSM	1996	-	VN4
54	LCR	M	50	HC	1996	A	VN4
56	LCR	M	29	HEM	1996	-	VN1
58	Sangue	F	43	HSM	1996	-	VN1
61	Sangue	F	19	HSM	1996	-	VN3
63	Sangue	M	25	HSM	1996	-	VN1
64	LCR	F	30	HSM	1996	-	VN3
65	LCR	M	29	HSA	1996	A	VN3
66	LCR	M	31	HEM	1996	-	VN3
68	Pele	M	35	HEM	1996	D	VN4
70	LCR	M	38	HSM	1996	A	VN3
71	Sangue	M	46	HSM	1996	-	VN3
72	LCR	M	32	HSM	1996	-	VN4
73	Pele	M	40	HCC	1996	AD	VN3
79	LCR	M	63	IPP	1997	D	VN4
80	LCR	M	32	IPP	1997	D	VN4
86	Sangue	M	33	HSM	1997	-	VN3
88	LCR	F	73	HSA	1997	A	VN1
89	LCR	M	38	HEM	1997	-	VN1
90	LCR	M	-	HSM	1997	-	VN3
91	LCR	M	37	HEM	1997	-	VN3
93	LCR	M	27	HSM	1997	-	VN1
94	LCR	M	59	HEM	1997	-	VN1
103	LCR	M	43	HSM	1997	-	VN4
109	LCR	M	35	HGH	1997	D	VN4
117	LCR	M	41	HSM	1998	-	VN3
118	LCR	M	27	IPO	1998	A	VN1

Tabela 5.2. (Cont.)

Nº. Estirpe	Amostra	Sexo	Idade	Hospital	Data ¹	Serótipo ²	Tipo Molecular ³
120	LCR	M	41	HSM	1998	-	VN4
121	LCR	M	38	HSM	1998	-	VN1
122	LCR	M	43	HSM	1998	-	VN2
123	LCR	M	37	HSM	1998	A	VN1
125	LCR	M	37	HSM	1998	-	VN3
126	LCR	M	32	HSM	1998	-	VN1
127	LCR	M	27	HEM	1998	-	VN4
130	LCR	M	44	HSM	1999	-	VN3
146	Sangue	F	37	HSM	1999	-	VN4
147	LCR	M	51	HSM	1999	-	VN1
152	LCR	M	37	HSM	2000	-	VN1
154	LCR	M	42	HSM	2000	-	VN1
155	LCR	M	37	HSM	2000	-	VN2
157	LCR	M	29	HPC	2000	-	VN1
159	LCR	M	51	HEM	2000	-	VN1
161	Sangue	M	51	HSM	2000	-	VN1
162	LCR	M	36	HSM	2000	-	VN4
165	Sangue	M	57	HSM	2000	-	VN3
166	LCR	F	29	HEM	2000	-	VN1
178	LCR	M	18	HEM	2000	-	VN3
179	LCR	F	25	HEM	2001	-	VN3
180	LCR	F	46	HSM	2001	-	VN2
181	LCR	M	62	HSM	2001	-	VN1
182	Sangue	M	62	HSM	2001	-	VN1
183	LCR	M	37	HSM	2001	-	VN1
186	LCR	F	29	HPC	2001	-	VN1
190	LCR	M	51	HSM	2001	-	VN3
193	LCR	M	40	HSM	2001	-	VN3
194	LCR	M	37	HSM	2001	-	VN1
196	LCR	M	52	HPC	2001	-	VN1

Tabela 5.2. (Cont.)

Nº. Estirpe	Amostra	Sexo	Idade	Hospital	Data ¹	Serótipo ²	Tipo Molecular ³
197	LCR	F	28	IPO	2001	-	VN1
199	Sangue	M	63	HSM	2002	-	VN1
201	LCR	M	42	HEM	2002	-	VN1
202	LCR	M	44	HSM	2002	-	VN1
204	LCR	M	34	HSM	2002	-	VN2
206	LCR	M	41	HSM	2002	-	VN2
207	LCR	M	46	HSM	2002	-	VN1
209	LCR	F	50	HSM	2002	-	VN3
211	LCR	M	31	HSM	2002	-	VN3
213	Sangue	M	42	HSM	2002	-	VN3
214	LCR	M	30	HSM	2003	-	VN1
216	LCR	M	32	HSM	2003	-	VN1
218	Sangue	F	37	HSM	2003	-	VN3
219	LCR	M	34	HSM	2003	-	VN1
220	LCR	M	59	HSM	2003	-	VN2
222	LCR	M	29	HSM	2003	-	VN1
227	LCR	M	67	HSM	2003	-	VN1
229	Sangue	M	39	HSM	2003	-	VN3
230	LCR	M	29	HSM	2003	-	VN4
231	LCR	F	24	HSM	2003	-	VN1
236	Sangue	M	49	HSM	2003	-	VN3
238	LCR	M	37	HEM	2003	-	VN3
240	Sangue	M	51	HSM	2003	-	VN2
241	LCR	M	31	HSM	2004	-	VN3
243	LCR	M	34	CHC	2004	-	VN2
244	LCR	M	32	HSM	2004	-	VN2
245	LCR	M	31	HSM	2004	-	VN1
246	LCR	M	50	HSM	2004	-	VN2
247	LCR	M	46	HSM	2004	-	VN2
249	LCR	M	35	HSM	2004	-	VN2

Tabela 5.2. (Cont.)

Nº. Estirpe	Amostra	Sexo	Idade	Hospital	Data ¹	Serótipo ²	Tipo Molecular ³
253	LCR	M	36	HSM	2004	-	VN1
255	Sangue	M	42	HSM	2005	-	VN3
256	LCR	M	39	HSM	2005	-	VN1
258	Sangue	M	58	HSM	2005	-	VN2
259	LCR	M	47	HSM	2006	-	VN1
260	LCR	M	26	HSM	2006	-	VN3
262	Sangue	M	32	HSM	2006	-	VN2
264	LCR	M	49	HSM	2006	-	VN3
265	LCR	M	50	HPC	2006	-	VN1
267	LCR	M	36	HSM	2006	-	VN1
269	LCR	M	41	HSM	2006	-	VN3
270	LCR	F	48	HEM	2006	-	VN1
272	LCR	M	37	HSM	2007	-	VN1
274	Sangue	F	47	HSM	2007	-	VN1
275	LCR	M	37	HSM	2007	-	VN1
278	LCR	M	47	HSM	2007	-	VN3
311	LCR	-	-	Vila Real	2007	-	VN2

¹Data de entrada do isolado na colecção do Laboratório de Micologia do IHMT/UNL; ²De acordo com Martins (2001); ³Determinado por RFLP do gene *URA5*, de acordo com Meyer *et al.* (2003); LCR – Líquido cefalorraquidiano; HEM - Hospital de Egas Moniz, Lisboa; HMB - Hospital Militar de Belém, Lisboa; HPC - Hospital Prisional de Caxias, Lisboa; HC - Hospital de Cascais, Cascais; HCC - Hospital Curry Cabral, Lisboa; HSM - Hospital Santa Maria, Lisboa; HSA - Hospital Santo António; CHC - Centro Hospitalar de Coimbra, Coimbra; IPO – Instituto Português de Oncologia, Lisboa; IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa [Nota: Parte dos tipos moleculares apresentados nesta tabela foram determinados pela Dra. Ana Paula Maduro, IHMT/UNL]

Tabela 5.3. Estirpes de origem ambiental utilizadas e respectivas amostras e locais de origem, data de isolamento e tipo molecular

Nº. Estirpe	Amostra e local	Data	Tipo molecular ¹
113	Fezes de pombo, Lisboa	1997	VN1
114	Fezes de pombo, Lisboa	1997	VN1
115	Fezes de pombo, Lisboa	1997	VN1
116	Fezes de pombo, Lisboa	1997	VN1
279	Material Vegetal, Vila Real	2007	VN1
281	Material Vegetal, Vila Real	2007	VN1
282	Material Vegetal, Vila Real	2007	VN1
283	Material Vegetal, Vila Real	2007	VN1
284	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
285	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
286	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
287	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
288	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
289	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN3
290	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN3
292	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN1
293	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN1
295	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
296	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
297	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
298	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN1
299	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
302	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
303	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
304	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4
305	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN1
307	Fezes de Pombo, Vila Real	2007	VN4

¹Determinado por RFLP do gene *URA5*, de acordo com Meyer *et al.* (2003); [Nota: Parte dos tipos moleculares apresentados nesta tabela foram determinados pela Dra. Ana Paula Maduro, IHMT/UNL]

Das estirpes clínicas com origem em produtos biológicos infectados, na sua esmagadora maioria obtidas de doentes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida, cerca de 82% foram isoladas a partir de líquido cefalorraquidiano (LCR) e apenas cerca de 15% correspondiam a hemoculturas (Figura 5.1A). Cerca de 85% dos isolados clínicos foram obtidos a partir de pacientes do sexo masculino (Figura 5.1B). Cerca de 40% dos doentes infectados com *C. neformans* tinha idades compreendidas entre 30 e 39 anos e cerca de 22% tinham idades inferiores a 30 anos (Figura 5.1C). Cerca de metade das estirpes foram isoladas no período entre os anos de 1991 a 1999 e as restantes no período compreendido entre 2000 e 2007 (Figura 5.1D). Dos isolados ambientais, cerca de 85% das estirpes foram isoladas a partir de fezes de pombos.

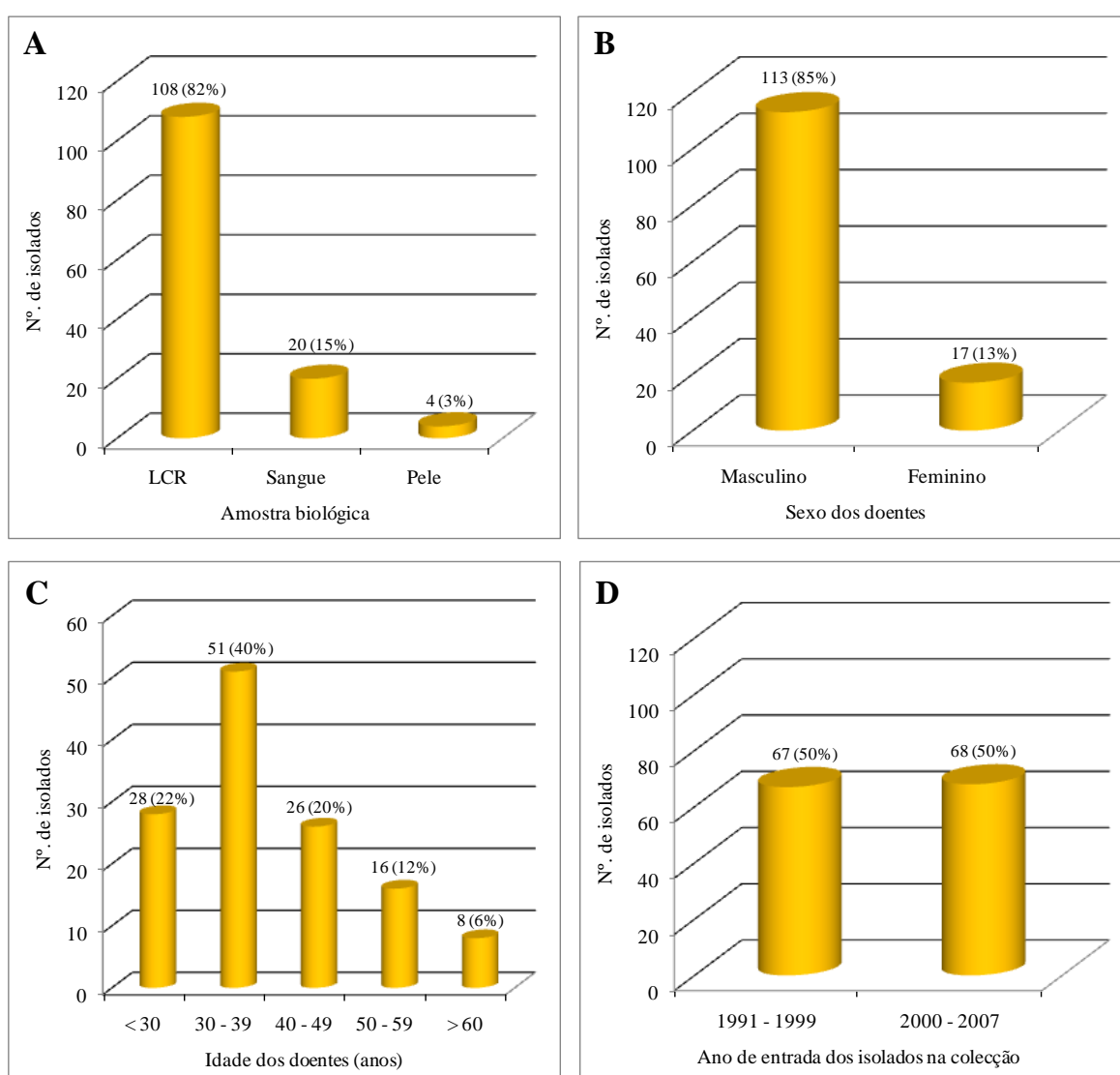


Figura 5.1. Distribuição dos isolados clínicos de *C. neformans* estudados por amostra de origem (A), sexo (B), idade dos doentes infectados (C) e ano de entrada da estirpe na colecção de culturas do IHMT (D).

5.2. RFLP do gene *URA5*

Como se pretendia estudar o perfil genómico de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* e compará-los aos resultados obtidos em outros estudos realizados noutras regiões do globo, por outros autores, o método de tipagem molecular utilizado neste trabalho foi idêntico ao por eles adoptado (RFLP do gene *URA5*, de acordo com Meyer *et al.* 2003). Os perfis de restrição das estirpes de referência normalmente utilizadas nesta metodologia (estirpes “WM”, ver Tabela 5.1), e também utilizadas neste trabalho, encontram-se ilustrados na Figura 5.2.

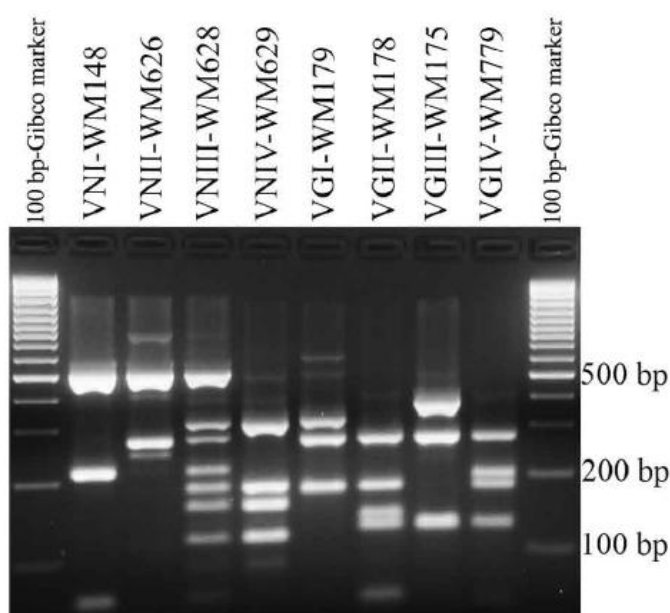


Figura 5.2. Perfis de restrição do gene *URA5* com as enzimas *Sau96I* e *HhaI* das estirpes de referência representantes dos vários tipos moleculares descritos de *C. neoformans* (imagem adaptada de Trilles *et al.* 2008)

Obtiveram-se perfis de restrição do gene *URA5* distintos para cada isolado de origem clínica e ambiental, que foram concordantes com um dos perfis das estirpes de referência utilizadas, permitindo uma rápida identificação do tipo molecular respectivo. As estirpes de referência utilizadas como controlo demonstraram também perfis idênticos aos descritos na literatura para as mesmas. Na Figura 5.3 encontram-se ilustrados os resultados obtidos para alguns dos isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* testados. Os perfis de RFLP de todos os isolados clínicos e ambientais, e das estirpes de referência, foram combinados num dendrograma (Figura 5.4). Os resultados detalhados da determinação dos

tipos moleculares para todas as estirpes de referência, clínicas e ambientais encontram-se nas Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3, respectivamente.

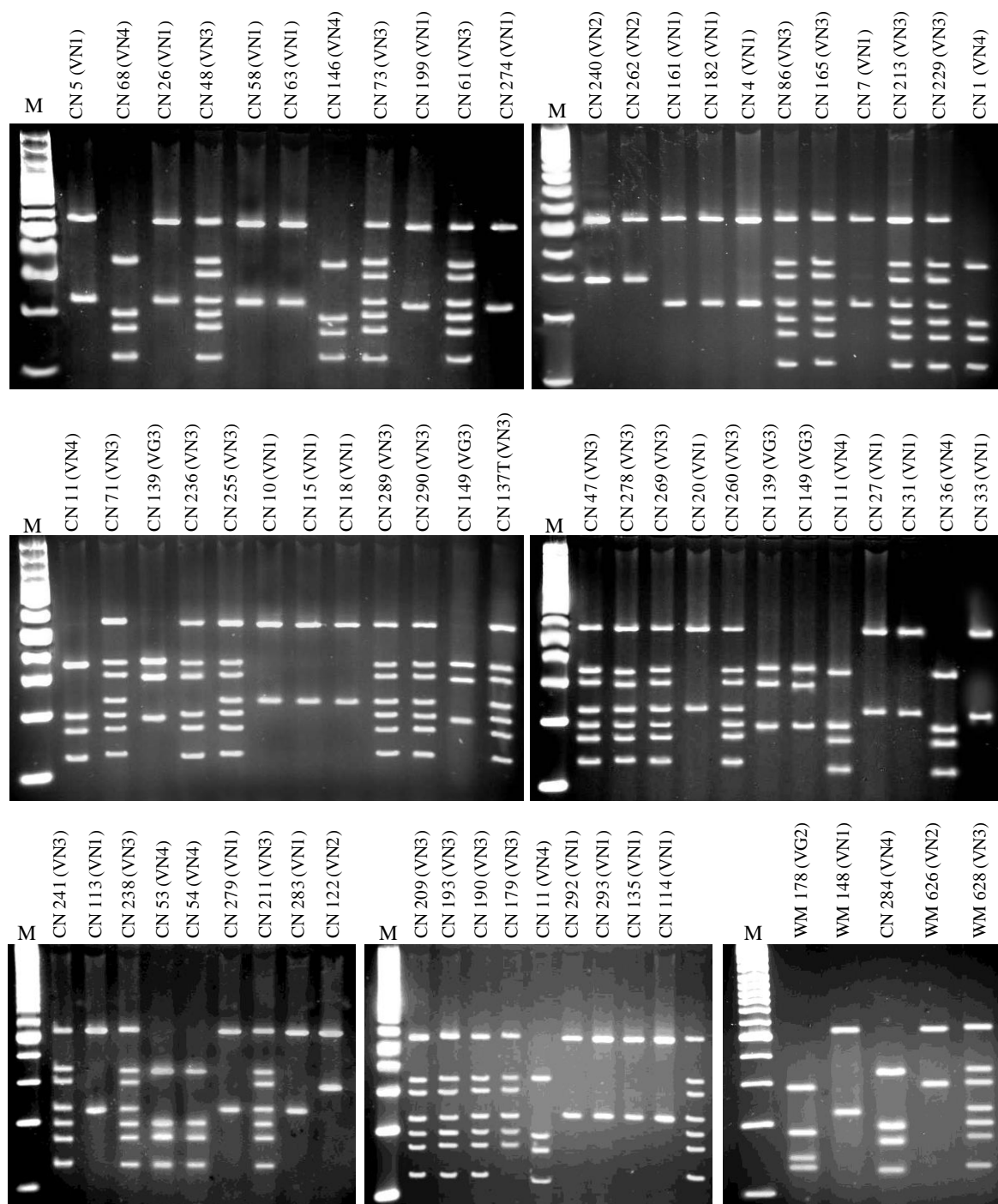


Figura 5.3. Ilustração dos perfis de restrição do gene *URA5* com as enzimas *Sau96I* e *HhaI* para alguns dos isolados clínicos, ambientais e de referência de *C. neoformans* testados; M – Marcador de pesos moleculares GeneRuler™ 100 bp (FERMENTAS)

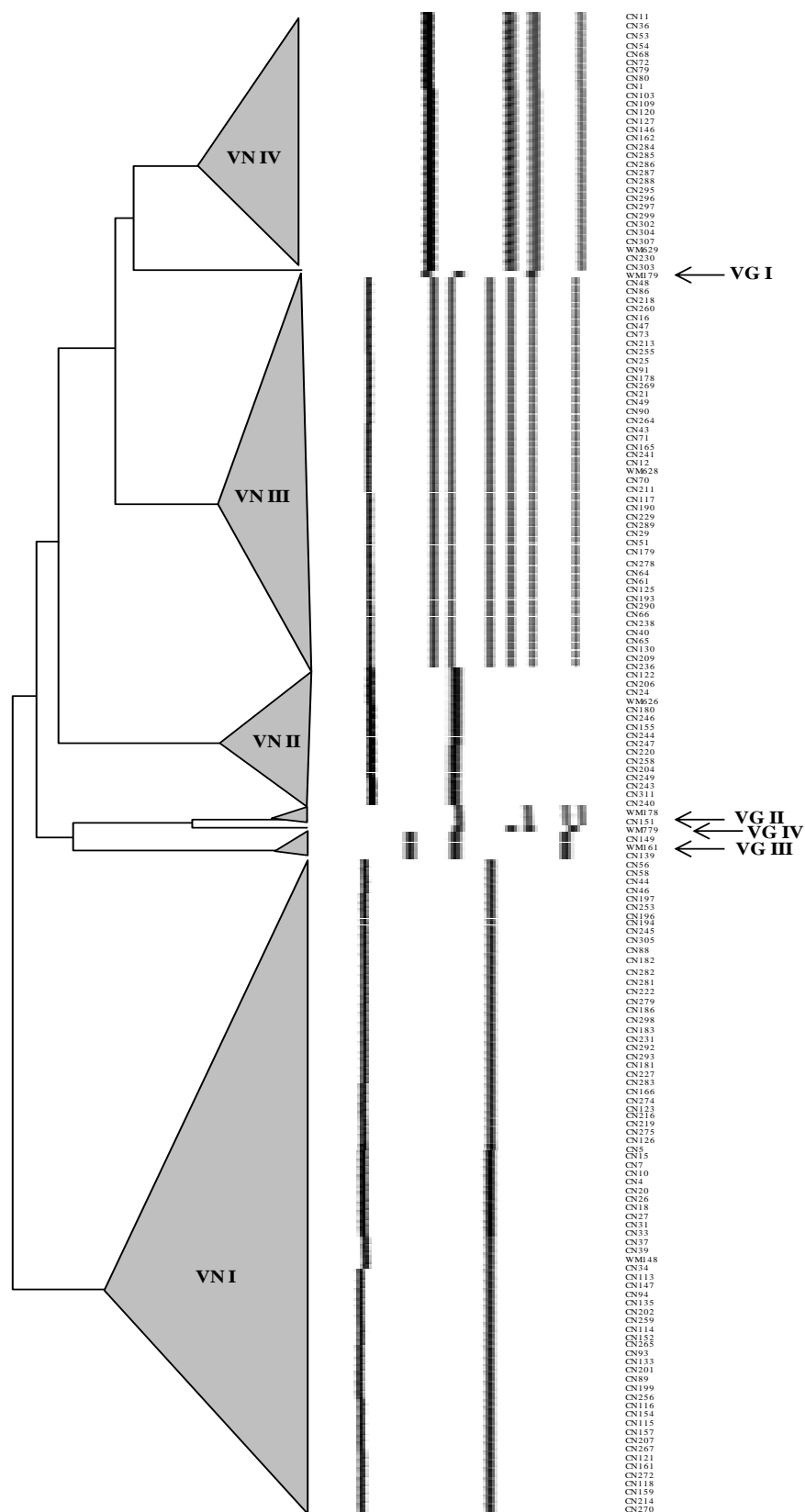


Figura 5.4. Dendrograma baseado no agrupamento dos perfis de restrição do gene *URA5* com as enzimas *Sau96I* e *HhaI* dos isolados clínicos, ambientais e de referência de *C. neoformans* testados. As semelhanças entre os vários perfis electroforéticos foram estimadas com o coeficiente de Pearson e os agrupamentos formados utilizando o método UPGMA (GelCompar, versão 1.01, Applied Maths)

Verificou-se a existência de quatro tipos moleculares principais entre os isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* estudados: VN1 e VN2, associados a estirpes de serótipo A, VN3, associadas ao serótipo AD, e VN4, associadas ao serótipo D. Não foram encontradas estirpes representantes de *Cryptococcus gattii* entre os isolados (correspondentes aos tipos moleculares VG1, VG2, VG3 ou VG4).

Globalmente, o tipo molecular VN1 foi o mais abundante entre os isolados de origem clínica (45% dos isolados), seguindo-se o grupo de estirpes híbridas correspondentes ao tipo molecular VN3 (31% dos isolados) (Figura 5.5A). Os tipos moleculares VN2 e VN4 foram os menos abundantes, correspondendo cada tipo a cerca de 12% dos isolados (Figura 5.5A). No que respeita especificamente às culturas de *C. neoformans* isoladas de amostras de LCR, a distribuição dos isolados pelos tipos moleculares é semelhante à anterior e foi a seguinte: 47% correspondiam ao tipo VN1, 12% ao tipo VN2, 28% ao tipo VN3 e 13% ao tipo VN4 (Figura 5.5B). Já em relação às hemoculturas analisadas, verificou-se que os isolados do tipo molecular VN3 foram mais abundantes (45%) que os do tipo VN1 (35%), seguidos dos tipos moleculares VN2 (15%) e VN4 (5%) (Figura 5.5C). No entanto, foi analisado um número reduzido de hemoculturas de *C. neoformans*, quando comparado com o número de culturas provenientes de LCR. Das quatro culturas isoladas de biopsias cutâneas, uma correspondia ao tipo molecular VN1, duas ao VN3 e uma ao VN4 (Tabela 5.2).

Curiosamente, observaram-se algumas alterações no padrão de abundância de alguns tipos moleculares de *C. neoformans* nos dois períodos 1991-1999 e 2000-2007 (Figura 5.5D). O tipo molecular VN1 mantém-se mais abundante em ambos os períodos (40% e 50% dos isolados em 1991-1999 e 2000-2007, respectivamente), seguido pelo tipo molecular VN3 (36% e 26% dos isolados em 1991-1999 e 2000-2007, respectivamente). Aparentemente, os isolados de *C. neoformans* do tipo VN1 ganharam ainda mais predominância no segundo, e mais recente, período. Por outro lado, verificou-se uma mudança drástica nas abundâncias dos tipos moleculares VN2 e VN4 entre os dois períodos. O tipo molecular VN4 era o terceiro mais abundante no período 1991-1999 (21% dos isolados), com a detecção de apenas algumas poucas estirpes do tipo molecular VN2 (3%). Estas posições inverteram-se totalmente no período 2000-2007, com a detecção de 21% de isolados do tipo VN2 e apenas 3% do tipo VN4 (Figura 5.5D).

O tipo molecular VN1 de *C. neoformans* foi sempre o mais detectado em todas as gamas de idades dos doentes infectados, com excepção da gama dos 40 aos 49 anos, em que o

tipo mais abundante foi o VN3 (Figura 5.5E). Também de destacar a ausência de isolados do tipo VN2 nos doentes infectados com menos de 30 anos idade (Figura 5.5E).

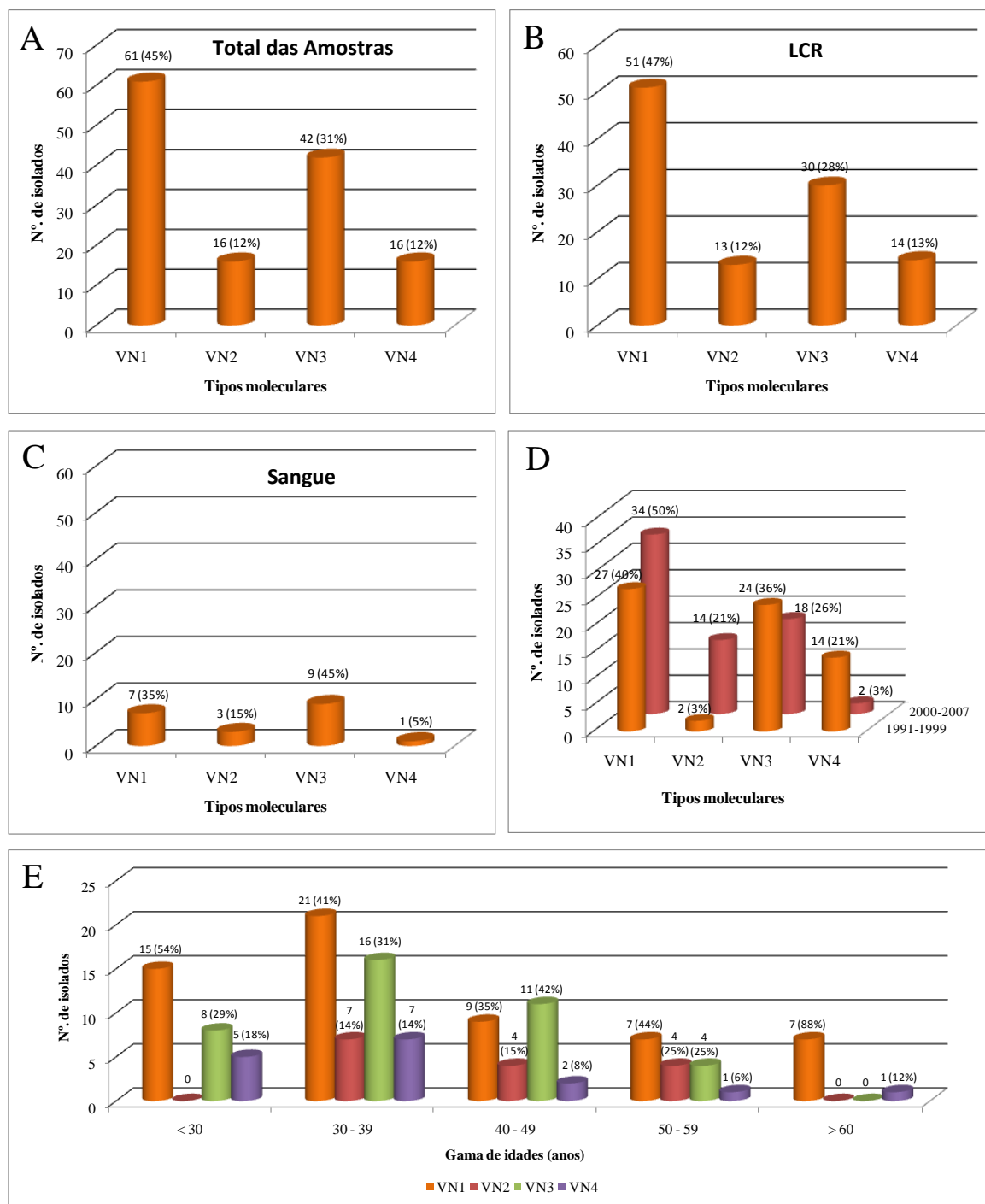


Figura 5.5. Distribuição dos tipos moleculares de *Cryptococcus neoformans* encontrados entre os isolados de origem clínica em função de número total dos isolados (A), dos isolados a partir de LCR (B) e de sangue (C), dos isolados em função da data de entrada na colecção do IHMT (D), correspondentes também à sua data de isolamento, e em função da gama de idades dos doentes infectados (E)

Relativamente aos isolados de *C. neoformans* de origem ambiental, em que a maioria é proveniente de fezes de pombos, 44% correspondiam ao tipo VN1, 7% ao tipo VN3 e 48% ao tipo VN4 (Figura 5.6). Não foi encontrada nenhuma estirpe de origem ambiental correspondente ao tipo molecular VN2 ou aos tipos associados a *C. gattii*. É de realçar a aparente abundância dos isolados do tipo molecular VN4 nas amostras ambientais de fezes de pombos, apesar deste tipo de *C. neoformans* ser dos menos abundantes entre os isolados de amostras de doentes infectados.

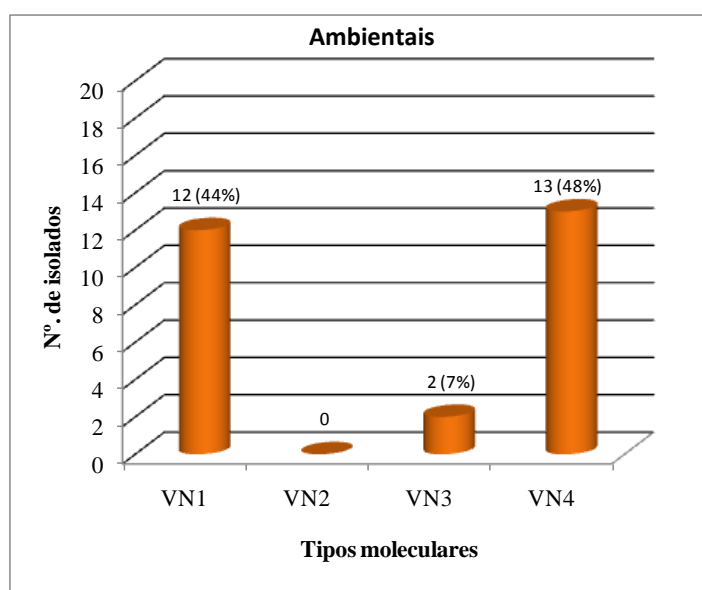


Figura 5.6. Distribuição dos tipos moleculares encontrados entre os isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans*

6. Discussão de resultados e considerações finais

O aumento do número de casos de micoses invasivas nos últimos anos, também devido ao aumento do número de doentes imunodeprimidos, como é o caso dos doentes infectados com o vírus VIH e doentes transplantados, entre outros, tem feito com que estas infecções se tornem cada vez mais relevantes para a saúde pública. A criptococose é uma das micoses mais comuns e letais nos doentes com SIDA, sendo prevalente em África, nomeadamente na África Central. A levedura patogénica oportunista *Cryptococcus neoformans*, no seu sentido lato (que inclui também a espécie relacionada *Cryptococcus gattii*), é a principal responsável por estas infecções fúngicas.

Têm sido realizados vários estudos de epidemiologia molecular de *C. neoformans* e existem actualmente métodos de tipagem moleculares minimamente estandardizados para estes fungos. Um destes métodos, dos mais utilizados para a tipagem de *C. neoformans*, baseia-se na análise dos perfis de restrição enzimática do gene *URA5*, que permite diferenciar os isolados em oito tipos moleculares: VN1, VN2, VN3 e VN4 (sub-tipos de *C. neoformans*) e VG1, VG2, VG3 e VG4 (sub-tipos de *C. gattii*) (Meyer *et al.* 2003). A aplicação deste método, e de outros relacionados e comparáveis, por diversos autores de várias regiões do Globo, tem contribuído para um conhecimento melhorado da epidemiologia de *C. neoformans* e da criptococose. Assim, e como já atrás foi realçado nesta dissertação, é sabido que o tipo molecular VN1 é o mais encontrado em várias regiões do globo, com ênfase para os países da América Latina (Meyer *et al.* 1999, 2003), como por exemplo o Brasil (Andrade-Silva *et al.* 2010; Casali *et al.* 2003; Igreja *et al.* 2004; Trilles *et al.* 2008) e a Colômbia (Escandon *et al.* 2006). Este tipo molecular VN1 corresponde também à esmagadora maioria dos isolados de *C. neoformans* de países asiáticos como Taiwan (Liaw *et al.* 2009) e a China (Feng *et al.* 2008). O tipo molecular VN2 é frequentemente o segundo mais abundante nos países da América Latina e da América do Norte, Austrália, entre outras regiões (Meyer *et al.* 1999). Outros tipos moleculares são bastante menos abundantes, incluindo os relacionados com *C. gattii*. Aliás, vários autores apontam para que a maioria das infecções por *C. neoformans* devam-se à variedade *C. neoformans* var. *grubii*, serótipo A, cujos isolados se distribuem pelos tipos moleculares VN1 e VN2. Estudos mais detalhados sobre a epidemiologia molecular de *C. neoformans* em Países Europeus são escassos e limitados, nomeadamente quanto ao reduzido número de estirpes normalmente estudadas. No entanto, existem evidências de

que, para além do tipo molecular VN1, também as estirpes dos tipos VN3 e VN4 (correspondentes às estirpes híbridas e de serótipo D, respectivamente) têm um papel importante na criptococose humana. Assim, os tipos moleculares VN3 e VN4 têm sido encontrados em estudos epidemiológicos em Itália (Meyer *et al.* 1999; Viviani *et al.* 1997, 2006; Tortorano *et al.* 1997), Espanha (Meyer *et al.* 2003) e França (Dromer *et al.* 1996). Os isolados de *C. gattii* são tradicionalmente considerados como habitantes de regiões tropicais e sub-tropicais e estão mais frequentemente associados a infecções em indivíduos imunocompetentes (Meyer *et al.* 2003). No entanto, foram detectados recentemente surtos de criptococose por esta espécie em regiões de clima temperado, no Canadá (Kidd *et al.* 2004). Também em Espanha foram recentemente detectados quase 32% de isolados com o tipo molecular VG1, apesar de terem sido analisadas poucas estirpes (Meyer *et al.* 2003).

Neste trabalho foi tipado um número alargado de estirpes de *C. neoformans* de origem clínica e ambiental, permitindo desenhar uma imagem epidemiológica mais detalhada desta espécie patogénica oportunista no nosso País, contribuindo também para um melhor conhecimento integrado da sua epidemiologia a nível Europeu e Global. Assim, confirma-se com este trabalho que o tipo molecular VNI de *C. neoformans* é o mais abundante entre os isolados de origem clínica no nosso País, de acordo com a maioria dos outros estudos realizados noutras regiões. No entanto, a abundância do tipo molecular VNI (45%) em relação a outros tipos moleculares não é esmagadora, como acontece p.e. em países asiáticos (Liaw *et al.* 2009; Feng *et al.* 2008) e noutros países da América Latina (Meyer *et al.* 2003). Em semelhança com outros países Europeus, como já atrás foi realçado, os tipos moleculares VN3 e VN4 são também abundantes em Portugal, correspondendo a 31% e a 12% dos isolados de origem clínica, respectivamente. O tipo molecular VNII correspondeu também a 12% destes isolados. Este tipo molecular é menos encontrado em países Europeus e, na realidade, foi registado com maior abundância entre os isolados Portugueses mais recentes (recolhidos entre os anos de 2000 e 2007), tendo sido raramente detectado entre os isolados recolhidos entre 1991 e 1999. A razão desta mudança no padrão epidemiológico deste tipo molecular de *C. neoformans* no nosso País é desconhecida, constituindo um tema interessante para estudos futuros.

Do total de isolados clínicos de *C. neoformans* estudados neste trabalho, existe informação sobre o respectivo serótipo para 19 estirpes (Martins, 2001) (Tabela 5.2). Destas, todas as seis estirpes do tipo molecular VN1 pertencem ao serótipo A. A única estirpe do tipo molecular VN2 com informação disponível do respectivo serótipo pertence também ao

serótipo A, como esperado. Também como esperado, cinco estirpes do tipo molecular VN4 pertencem ao serótipo D. Uma sexta estirpe do tipo VN4 (CN 54) apresentava, no entanto, o serótipo A. Esta aparente discrepância entre tipo molecular e serótipo merece ser investigada futuramente, sendo que o serótipo da estirpe CN 54 foi já confirmado recorrendo a métodos moleculares (Lucas *et al.* 2010). Das sete estirpes híbridas correspondentes ao tipo molecular VN3, apenas três apresentavam o serótipo AD (CN 40, CN 49 e CN73) (Tabela 5.2). As restantes três estirpes do tipo VN3 apresentavam o serótipo A (CN 43, CN 65 e CN 70) e uma estirpe o serótipo D (CN 48). No entanto, são conhecidas as fragilidades dos métodos de serotipagem de *C. neoformans*, sendo que as estirpes CN 48, CN 65 e CN 70 foram de facto já confirmadas como sendo estirpes híbridas AD recorrendo a métodos moleculares (Lucas *et al.* 2010). Estes autores não confirmaram, no entanto, a origem híbrida da estirpe CN 43, merecendo este caso ser também investigado futuramente.

Não foi encontrado qualquer representante da espécie *C. gatti* entre os isolados Portugueses de origem clínica. Tal facto não será totalmente surpreendente, pois a esmagadora maioria dos isolados clínicos analisados neste trabalho tiveram origem em doentes infectados VIH positivos, sendo a espécie *C. gatti* mais associada a infecção em indivíduos imunocompetentes. Esta espécie também não foi encontrada entre os isolados de origem ambiental. No entanto, foram analisadas apenas poucas estirpes de origem ambiental, na sua maioria provenientes de fezes de pombos recolhidas de uma única localização geográfica (Vila Real). Tendo em conta que *C. gatti* foi já por exemplo encontrada com relativa abundância em Espanha (Meyer *et al.* 2003) e tem sido associada a casos humanos de micoses invasivas também em climas temperados (Kidd *et al.* 2004), mais estudos de isolamento e caracterização desta espécie a partir de ambientes clínicos e ambientais são necessários para elucidar sobre o seu real potencial patogénico no nosso País.

Entre os isolados de origem ambiental foram encontrados essencialmente os tipos moleculares VN1 e VN4. Tendo em conta que, como já atrás foi realçado, apenas foram analisados um número reduzido de isolados de origem ambiental, não deixa de ser estranho não terem sido detectados mais representantes dos tipos moleculares VN2 e VN3 (abundantes em Portugal entre os isolados de origem clínica). Deste modo, é reforçada novamente a necessidade de levar a cabo mais estudos de isolamento destes fungos a partir

de amostras ambientais, de modo a elucidar sobre os eventuais reservatórios destas espécies patogénicas no nosso País.

Este trabalho contribui para um melhor conhecimento da diversidade molecular e epidemiologia de *Cryptococcus neoformans* em Portugal. No entanto, e talvez mais importante, levanta mais questões sobre esta importante espécie do que àquelas a que responde. E o que está por desvendar é sempre o que nos faz correr.

7. Referências bibliográficas

- ABRAHAN, M., MATHEWS, V., GANESH, A., JOHN, J., MATHEWS, M.S. 1997. Infection caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B in an AIDS patient in India. J. Med. Vet. Mycol. 35: 283-284.
- ANDRADE-SILVA, L., K. FERREIRA-PAIM, M. L. SILVA-VERGARA, A. L. PEDROSA. 2010. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. Fungal Biology (doi:10.1016/j.funbio.2010.03.005).
- BETTOLI, V., VIRGILI, A., ZAMPINO, M.R., BEDETTI, A., MONTANARI, P. 1993. Cutaneous cryptococcosis in AIDS: succesfull treatment with itraconazole. Mycoses 36: 433-435.
- BLEVINS, L.B., FENN, J., SEGAL, H., NEWCOMB-GAYMAN, P., CARROLL, K.C. 1995. False-positive cryptococcal antigen latex agglutination caused by disinfectants and soaps. J. Clin. Microbiol. 33: 1674-1675.
- BOEKHOUT, T., THEELEN, B., DIAZ, M., FELL, J.W., HOP, W.C., ABELN, E.C., DROMER, F., MEYER, W. 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 147: 891-907.
- BRANDT M, HUTWAGNER LC, KLUG LA, BAUGHMAN WS, RIMLAND D, GRAVISS EA, HAMILL RJ, THOMAS C, PAPPAS PG, REINGOLD AL, PINNER RW. 1996. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas in United States. J. Clin. Microbiol. 34: 912-917.
- BRASIL, K.W., PINHEIRO, R.L., PIMENTEL, I.C. 2003. Diagnostico Laboratorial de Micoses Superficiais e Cutâneas: Comparação dos Métodos do Hidroxido de Potassio e do Calcofluor White. An. Bras. Dermatol. 78: 547-551.
- BRUESKE, C.H. 1986. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 23: 631-633.
- CAMERON, M.L., BARTLE, J.A., GALLIS, H.A., WASKIN, H.A. 1991. Manifestation of pulmonary cryptococcosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Rev. Infect. Dis. 13: 64-67.
- CARVALHO, A., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., MARTINS, M.L., VAZ-PINA, C., RODRIGUES, A.G., LUDOVICO, P., RODRIGUES, F. 2007. Multiplex PCR identification of some clinically relevant species. Med. Mycol. 49: 619-627.
- CASADEVALL, A., PERFECT, J.R. 1998. *Cryptococcus neoformans*. ASM press Books, Washington.
- CASALI AK, GOULART L, ROSA E SILVA LK. 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. FEMS Yeast Res. 3: 405 – 415.
- CASTAÑÓN-OLIVARES, L.R., LÓPEZ-MARTINEZ, R., BARRIGA-ANGULO, G., RIOSROSAS, C. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient: first observation in Mexico. J. Med. Vet. Mycol. 35:57-59.

- CHANG, Y.C., KWON-CHUNG K.J. 1994. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4912-4919.
- CHEN, Y.C., EISNER, J.D., KATTAR, M.M., RASSOULIAN-BARRETT, S.L., LAKE, K., YARFITZ, S.L., LIMAYE, A.P., COOKSON, B.T. 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2302-2310.
- CLUMEK N, SONNET J, Taelman H, MASCART-LEMONT F, DE BRUYERE M, VANDEPERRE P, DASNOY J, MARCELIS L, LAMY M, JONAS C, EYCKMANS L, NOEL H, VANHAEVERBEEK M, BUTZLER JP. 1984. Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. *N. Engl. J. Med.* 320: 492-497.
- COGLIATI, M., ALLARIA, M., TORTORANO, A.M., VIVIANNI, M.A. 2000. Genotyping *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* with specific primers designed from PCR-fingerprinting bands sequenced using a modified PCR-based strategy. *Med. Mycol.* 38: 97-103.
- DE HOOG, G.S., GAURRO, J., GENE, J., FIGUERAS, M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd Ed.
- DENNING, D.W., ARMSTRONG, R.W., LEWIS, B.H., STEVENS, D.A. 1991. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis. *Am. J. Med.* 91: 267-272.
- DESMET P, KAYEMBE KD. 1989. The value of cryptococcal antigen screening among HIV-positive/AIDS patients in Kinshasa, Zaire. *AIDS* 3: 77-78.
- DISMUKES, W. 1988. Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 157: 624-628.
- DONG, Z.M., MURPHY, J.W. 1995. Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. *Infect. Immun.* 63: 2632-2644.
- DROMER F, VARMA A, RININ O, MATHOULIN S, DUPONT B. 1994. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2364- 2371
- DROMER, F., MATHOULIN, S., DUPONT, B., LAPORTE, A., and the French Cryptococcosis Study Group. 1996. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. *Clin. Infect. Dis.* 23: 82-90.
- ELLIS, D.H., PFEIFFER, T.J. 1992. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Epidemiol.* 8: 321-325.
- ENGLER, H.D., SHEA, Y.R. 1994. Effect of potential interference factors on performance of enzyme immunoassay and latex agglutination assay for cryptococcal antigen. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2307-2308.
- ESCANDON P, SANCHEZ A, MARTINEZ M, MEYER W, CASTANEDA E. 2006. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus*

neoformans species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. FEMS Yeast Res. 6: 625–635.

- EVANS, E.E. 1949. An immunologic comparison of twelve strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71: 644-646.
- EVANS, E.E. 1950. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I: A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. J. Immunol. 60: 423-430.
- EVANS, E.E. 1960. Capsular reactions of *Cryptococcus neoformans*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 89: 184-192.
- EVANS, E.E., KESSEL, J.F. 1951. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. II . Serologic studies with the capsular polysaccharide. J. Immunol. 67: 109-114.
- EVERTSSON, U., MONSTEIN, H., JOHANSSON, A. 2000. Detection and identification of fungi in blood using broad-range 28S rDNA PCR amplification and species-specific hybridisation. APMIS 108: 385-392.
- FENG X., Z. YAO, D. REN, W. LIAO, J. WU. 2008. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. FEMS Yeast Res. 8: 930 – 938.
- FERNANDES, O. F., COSTA, T. R., COSTA, M. R., SOARES, A. J., PEREIRA, A. J., SILVA, M R. 2000. *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 33: 75 – 78.
- FISHER, D., BURROW, J., LO, D., CURRIE, B. 1993. *Cryptococcus neoformans* in tropical northern Australia: predominantly variant *gattii* with good outcomes. Aust. N. Z. Med. 23: 678-682.
- FRANZOT SP, HAMDAN JS, CURRIE BP, CASADEVALL A. 1997. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal phenotypes. J. Clin. Microbiol. 35: 2243-2251.
- FRANZOT, S.P., SAKLIN, I.F., CASADEVALL, A. 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J. Clin. Microbiol. 37: 838-840.
- GARCIA-HERMOSO D, DROMER F, MATHOULIN-PELISSIER S, JANBON G. 2001. Are two *Cryptococcus neoformans* strains epidemiologically linked? J. Clin. Microbiol. 39: 1402-1406.
- GRIESO G, GALLO M. 1997. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental and clinical sources in extreme southern Italy (Calabria and Sicily, central Mediterranean area). Mycoses 40: 95-100.
- GUARRO, J., GENE, J., STCHIGEL, A.M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. Clin. Microbiol. Rev. 12: 454-500.

- GUREVITZ, O., GOLDSCHMIED-REUVEN, A., BLOCK, C., KOPOLOVIC, J., FARFEL, Z., HASSIN, D. 1994. *Cryptococcus neoformans* vertebral osteomyelitis. J. Med. Vet. Mycol. 32: 315-318.
- HAMILTON, J.R., NOBLE, A., DENNING, D.W., STEVENS, D.A. 1991. Performance of *Cryptococcus* Antigen latex agglutination Kits on serum and cerebrospinal fluid specimens of AIDS patients before and after pronase treatment. J. Clin. Microbiol. 29: 333-339.
- HOFFMANN, S., STENDERUP, J., MATHIESEN, L. R. 1991. Low yield of screening for cryptococcal antigen by latex agglutination assay on serum and cerebrospinal fluid from Danish patients with AIDS or ARC. Scand. J. Infect. Dis. 23: 697-702.
- HOPFER, R.L., WALDEN, P., SETTERQUIST, S., HIGHSMITH, W.E. 1993. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. J. Med. Vet. Mycol. 31: 65-75.
- HULL, C.M., HEITMAN, J. 2002. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. Annu. Rev. Genet. 36: 557-615.
- IGREJA R P, LAZÉRA M, WANKE B, GALHARDO M C, KIDD S E, MEYER W. 2004. Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of Brazilian city, Rio de Janeiro. Medical Mycology, 42: 229-238
- IKEDA, R., NISHIKAWA, A., SHINODA, T., FUKAZAWA, Y. 1985. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. Microbiol. Immunol. 29: 981-991.
- IKEDA, R., NISHIMURA, S., NISHIKAWA, A., SHINODA, T. 1996. Production of agglutinating monoclonal antibody against antigen 8 specific for *C. neoformans* serotype D. Clin. Diag. Lab. Immunol. 3: 89-92.
- JACOBSON, E.S., EMERY, H.S. 1991. Catecholamine uptake, melanization, and oxygen toxicity in *Cryptococcus neoformans*. J. Bacteriol. 173: 401-403.
- JACOBSON, E.S., JENKINS, N.D., TODD, J.M. 1994. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. Infect. Immun. 62: 4085-4086.
- KAPLAN, W., BRAGG, S.L., CRANEL S., AHEARN, D.G. 1981. Serotyping *Cryptococcus neoformans* by immunofluorescence. J. Clin. Microbiol. 14: 313-317.
- KIDD, S. E., F. HAGEN, R. L. TSCHARKE, M. HUYNH, K. H. BARTLETT, M. FYFE, L. MACDOUGALL, T. BOEKHOUT, K. J. KWON-CHUNG, W. MEYER. 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). PNAS 101: 17258 – 17263.
- KWON-CHUNG, K.J. 1975. A new genus, *Filobasidiella* the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia 67: 1197-1200.
- KWON-CHUNG, K.J. 1976. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Mycologia 68: 942-946.
- KWON-CHUNG, K.J. 1998. *Filobasidiella* Kwon-Chung. In The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th ed., C.P. Kurtzman and J.W. Fell (Eds.), pp. 656-662, Elsevier, Amsterdam.

- KWON-CHUNG, K. J., T. BOEKHOUT, J. W. FELL, AND M. DIAZ. 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51:804–806.
- KWON-CHUNG, K.J., KOZEL, T.R., EDMAN, J.C., POLACHECK, I., ELLIS, D., SHINODA, T., DROMER, F. 1992. Recent advances in biology and immunology of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 30:133-142.
- LATOUCHE, G. N., M. HUYNH, T. C. SORRELL, AND W. MEYER. 2003. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the Phospholipase B (*PLB1*) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2080–2086.
- LIAW, S.-J., H-C. WU, P-R. HSUEH. 2009. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. *Clin. Microbiol. Infect.* (10.1111/j.1469-0691.2009.02930.x)
- LIN, X., HEITMAN, J. 2006. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 69–105.
- LUCAS S., MARTINS M. L., FLORES O., MEYER W., SPENCER-MARTINS I., INÁCIO J. 2010. Differentiation of *Cryptococcus neoformans* varieties and *Cryptococcus gattii* using *CAP59*-based loop-mediated isothermal DNA amplification. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16: 711 – 714.
- MARTINS, M.L. 2001. Polimorfismos Fenéticos e Diagnóstico Molecular de *Cryptococcus neoformans*. Dissertação de doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- MARTINS M.L., FERREIRA A.S., SAMPAIO A. VIEIRA R., INÁCIO J. 2010. Direct and specific identification of *Cryptococcus neoformans* in biological samples using fluorescently-labelled DNA probes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29: 571 – 576.
- MEYER, W, CASTAÑEDA A, JACKSON S, HUYNH M, CASTAÑEDA E, and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. 2003. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 189-195.
- MEYER, W., MARSZEWSKA, K., AMIRMOSTOFIAN, M., IGREJA, R., HARDTKE, C., METHLING, K., VIVIANI, M.A., CHINDAMPORN, A., SUKROONGREUNG, S., JOHN, M.A., ELLIS, D., SORRELL, T. 1999. Molecular typing of global isolates of *C. neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 20: 1790-1799.
- MIRZA SA, PHELAN M, RIMLAND D. 2003. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population based active surveillance from 2 large metropolitan areas 1992-2000. *Clin. Infect. Dis.* 36: 789-794.
- MITCHELL, T.G., PERFECT, J.R. 1995. Cryptococcosis in the Era of AIDS – 100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 515-548.

- MURAKAWA, G., KERSCHMANN, R., BERGER, T. 1996. Cutaneous *Cryptococcus* infection and AIDS. Report of 12 cases and review of the literature. Arch. Dermatol. 132: 545-548.
- NEILSON, J.B., IVEY, M.H., BULMER, G.S. 1978. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. Infect. Immun. 20: 262-266.
- NOSANCHUK, J.D., CASADEVALL, A. 1997. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin and monoclonal antibody binding. Infect. Immun. 65: 1836-1841.
- ODOM, A., MUIR, S., LIM, E., TOFFALETTI, D., PERFECT, J., HEITMAN, J. 1997. Calcineurin is required for virulence of *C. neoformans*. EMBO J. 16: 2576-2589.
- PERFECT, JR, KETABCHI N, COX GM, INGRAM C, BEISER CL. 1993. Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. J. Clin. Microbiol. 31: 3305-3309.
- PERFECT, J.R., MAGEE, B.B., MAGEE, P.T. 1989. Separation of Chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulse field gel electrophoresis. Infect. Immun. 57: 2624-2627
- POLACHECK, I., HEARING, V.J., KWON-CHUNG, K.J. 1982. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. J. Bacteriol. 150: 1212-1220.
- POWDERLY, W.G., CLOUD, G.A., DISMUKES, WES, M.S. 1994. Measurement of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid: value in the management of AIDS-associated cryptococcal meningitis. Clin. Infect. Dis. 18: 789-792.
- RAPPELLI, P., ARE, R., CASU, G., FIORI, P.L., CAPPUCCINELLI, P., ACETI, A. 1998. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 36: 3438-3440.
- RHODES, J.C., POLACHECK, I., KWON-CHUNG, K.J. 1982. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. 36: 1175-1184.
- RICHARDSON, M.D., WARNOCK, D.W. 2003. Fungal Infection – Diagnosis and Management. Blackwell Publishing. 3rd edition.
- ROZENBAUM, R., GONÇALVES, A.J., WANKE, B., CAIUBY, M.J., CLEMENTE, H., LAZERA, M.D.S., MONTEIRO, P.C.E, LONDERO, A.T. 1992. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. Mycopathologia 119: 133-136.
- SCHEPELMANN, K., MULLER, F., DICHGANS, J. 1993. Cryptococcal meningitis with severe visual and hearing loss radiculopathy in a patient without immunodeficiency. Mycoses 36: 492-432.
- SORRELL, T.C., BROWNLEE, A.G., RUMA, P., MALIK, R., PFEIFFER, T.J., ELLIS D.H. 1996a. Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J. Clin. Microbiol. 34: 1261-1263
- SORRELL, T.C., CHEN, S.C.A., RUMA, P., MEYER, W., PFEIFFER, T.J., ELLIS D.H., BROWNLEE, A.G. 1996b. Concordance of clinical and environmental isolates of

- Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 34: 1253-1260.
- SPEED, B., DUNT, D. 1995. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Clin. Infect. Dis. 21: 28-34.
 - SRIBUREE P, KHAYHAN S, KHAMWAN C, PANJASEE S, THARAVICHITKUL P. 2004. Serotype and PCR-fingerprint of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai, Thailand. Mycopathologia 158: 25-31.
 - STEENBERGEN, J.N., CASADEVALL, A. 2000. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) isolates in New York City. J. Clin. Microbiol. 38: 1974-1976.
 - STEINBACH, W.J., MITCHELL, T.G., SCHELL, W.A., ESPINEL-INGROFF, A., COICO, R.F., WALSH, T.J., PERFECT, J.R. 2003. Status of Medical Mycology Education. Medical Mycology. 41: 457-467.
 - TANAKA, K., MIYAZAKI, T., MAESAKI, S., MITSUTAKE, K., KAKEYA, H., YAMAMOTO, Y., YANAGIHARA, K., HOSSAIN, M.A., TASHIRO T., KOHNO, S. 1996. Detection of *Cryptococcus neoformans* gene in patients with pulmonary Cryptococcosis. J. Clin. Microbiol. 34: 2826-2828.
 - TORTORANO, A.M., VIVIANI, M.A., RIGONI, A.L., COLIGATI, M., ROVERSELLI, A., PAGANO, A. 1997. Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy. Mycoses 40: 297-302.
 - TRILLES L., M. S. LAZÉRA, B. WANKE, R. V. OLIVEIRA, G. G. BARBOSA, M. M. NISHIKAWA, B. P. MORALES, W. MEYER. 2008. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103: 455 – 462.
 - VANDEPITTE, J. 1990. Clinical aspects of cryptococcosis in patients with AIDS. In Mycoses in AIDS patients. H. Vanden Bossche, D. Mackenzie, G. Cauwenbergh, J. Van Cutsem, E. Drouhet, B. Dupont, (Eds.). pp.115-122, Plenum Press, New York
 - VARMA, A., SWINNE, D., STAIB, F., BENNETT, J.E., KWON-CHUNG, K.J. 1995. Diversity of DNA fingerprints in *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 33: 1807-1814.
 - VIVIANI MA, COGLIATI M, ESPOSTO MC et al. 2006. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. FEMS Yeast Res. 6: 614–619.
 - VIVIANI MA, WEN H, ROVERSELLI A, CALDERELLI-STEFAÑO R, COGLIATI M, FERRANTE P, et al. 1997. Identification by polymerase chain reaction fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. J. Med. Vet. Mycol. 35:355–360.
 - WANG, Y., AINSEN, P., CASADEVALL, A. 1995. *Cryptococcus neoformans* melanin and fungal virulence: mechanisms of action. Infect. Immun. 63: 3131-3136.
 - WHITTIER, S., HOPFER, R.L., GILLIGAN, P.H. 1994. Elimination of false-positive serum reactivity in latex agglutination test for cryptococcal antigen in human immunodeficiency virus-infected population. J. Clin. Microbiol. 32: 2158-2161.

- WILSON, D.E., BENNETT, J.E., BAILEY, J.W. 1968. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 127: 820-830.